

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Effet d'une complémentation in vivo avec un nutraceutique à base de glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'Harpagophytum procumbens sur l'activité enzymatique articulaire de chevaux sains.**

Schulsse, Samuel

*Award date:*  
2009

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Effet d'une complémentation *in vivo* avec un nutraceutique à base de glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* sur l'activité enzymatique articulaire de chevaux sains**

SCHULSSE Samuel

Résumé

Les pathologies articulaires telles que l'ostéoarthrite sont à l'origine de boiteries chez le cheval et sont principalement caractérisées par une destruction progressive du cartilage articulaire par protéolyse des constituants de la matrice extracellulaire (MEC). Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont impliquées dans le processus pathologique et il apparaît que des molécules telles que la glucosamine ou le chondroïtine sulfate modulent *in vitro* l'activité enzymatique de ces protéines. L'objectif de cette étude est d'investiguer l'effet d'une complémentation *in vivo* avec un nutraceutique à base de glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* sur les scores de boiteries et l'activité enzymatique articulaire (MMP-2) chez le cheval. Quatorze poneys cliniquement sains ont reçu pendant six semaines un nutraceutique à base de glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* (groupe A, n=7) ou un placebo (placebo B, n=7). Des examens orthopédiques ont été effectués avant (T0) et après (T6) la période de complémentation afin d'établir des scores de boiteries. Le liquide synovial des boulets a été prélevé *post-mortem* et l'activité MMP-2 a été quantifiée par gélatine zymographie. De manière à investiguer le mécanisme d'action par lequel le complément agit, des cultures de chondrocytes ont été réalisées et leur réponse à une stimulation à l'IL-1 $\beta$  a été étudiée en quantifiant l'activité MMP-2 dans les surnageants par gélatine zymographie et en quantifiant la capacité de liaison de NF- $\kappa$ B dans les extraits nucléaires par Trans-AM p65. Les scores de boiteries sont significativement améliorés dans le groupe A entre T0 et T6 (P<0,05). La concentration en protéines synoviales totale à T6 est significativement inférieure dans le groupe A comparé au groupe B (P<0,05). L'activité MMP-2 dans la synovie et les surnageants est significativement supérieure dans le groupe A comparé au groupe B (P<0,05). Enfin, aucune capacité de binding de NF- $\kappa$ B n'a pu être observée dans les extraits nucléaires liée très probablement à des problèmes techniques. En conclusion, il semble qu'une complémentation de six semaines avec un nutraceutique contenant de la glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* possède un effet bénéfique sur l'articulation de chevaux sains. Néanmoins, une investigation sur d'autres MMP que la MMP-2 devraient être réalisée, de même qu'une investigation de chacun des composants du complément testé.

Mémoire de master en [Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire](#)

Janvier 2009

Promoteur: N. Kirschvink

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTES DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0).81.72.44.18 – Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joëlle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Effects of an *in vivo* supplementation with a nutraceutical containing glucosamine, chondroïtin sulphate and *Harpagophytum procumbens* extracts on articular enzyme activity of healthy ponies**

SCHULSSE Samuel

Abstract

Articular joint diseases such osteoarthritis are responsible for lameness in horses and are characterised by a progressive degradation of the cartilage by proteolysis of extracellular matrix components. Matrix metalloproteinases (MMP) are implicated in the progress of the degradation and many studies have demonstrated that molecules like glucosamine and chondroïtin sulphate act on enzyme activity of these proteins *in vitro*. The aim of this study was to assess the effects of an *in vivo* supplementation with glucosamine, chondroïtin sulphate and *Harpagophytum procumbens* extracts on lameness score and synovial MMP-2 activity. For this, fourteen healthy young ponies received during six weeks a supplement containing glucosamine, chondroïtin sulphate and *Harpagophytum procumbens* extracts (group A, n=7) or a placebo (group B, n=7). Joint flexion tests were performed before (T0) and after the supplementation (T6) in order to establish lameness scores. Synovial fluids were punctured from fetlocks *post-mortem* and MMP-2 activity was quantified by gelatin zymography. To assess the mechanism of action of the nutraceutical, chondrocyte cultures were realized from fetlocks of experimental horses and their response to IL-1 $\beta$  was investigated through the quantification of the MMP-2 activity in supernatants by gelatin zymography and the quantification of active NF- $\kappa$ B in cells. If no significant difference could be established in group B between T0 and T6, lameness scores in group A decreased significantly at T6 compared to T0 scores (P<0.05). Total synovial proteins were significantly higher in group B compared to group A (P<0.05). Gelatin zymography showed a significant increase of synovial and supernatant MMP-2 activity in group A compared to group B (P<0.05). Trans-AM p65 was realised but no NF- $\kappa$ B binding activity could be quantified in nuclear extracts due to technical problems. In conclusion, a six weeks supplementation with a nutraceutical containing glucosamine, chondroïtin sulphate and *Harpagophytum procumbens* extracts appear to have beneficial effect on joints of healthy horses but further studies on other MMP in both synovial fluids and cell culture supernatants as well as on the mechanism of action of each component of the tested complement remain to be performed.

Master thesis in [Biochemistry and molecular and cellular Biology](#)

January 2009

Promotor: N. Kirschvink

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice, le professeur Nathalie Kirschvink, directrice de l'unité de Physiologie Animale aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, pour son soutien et ses généreux conseils prodigués durant la réalisation de ce mémoire.

Laetitia Wiggers, biotechnicienne au laboratoire de Physiologie Animale, pour son aide lors des manipulations ainsi que pour mon apprentissage des bonnes pratiques au laboratoire.

Marie Daix, doctorante et assistante au laboratoire de Physiologie Animale, pour son soutien.

Jean-François Bastin, docteur en médecine vétérinaire, pour les examens orthopédiques effectués et l'établissement des scores de boiteries.

Le personnel du Centre de Recherches Ovines (CRO), et plus particulièrement Marianne Raes pour le soin apporté aux poneys.

Martine Raes, professeur au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC), pour son aide dans la partie de l'investigation concernant NF- $\kappa$ B.

Noelle Ninane, biotechnicienne au département au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC), pour la mise au point de l'immunofluorescence et la réalisation des photos de microscopie confocale.

La société Twydil Pavesco, pour nous avoir fourni le complément alimentaire testé et l'intérêt qu'elle porte à notre travail.

Je remercie, bien évidemment, ma famille pour son soutien inconditionnel surtout dans les grands moments de doutes.

Et enfin, à mes amis (Auré, Annick, Ludo, Chris, Sophie-Robert, Emy, Mel), pour ces cinq années de pur bonheur, pour votre soutien.

Un grand merci à tous !

# Table des matières

<b>1. Introduction .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Articulation saine.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Constituants d'une articulation .....	8
<b>1.2 Les pathologies articulaires chez le cheval .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Ostéocondrose .....	12
1.2.2 Ostéoarthrite .....	12
<b>1.3 Les métalloprotéinases matricielles .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Généralités.....	13
1.3.2 Structure moléculaire des MMP .....	14
1.3.3 Régulation de l'activité MMP .....	14
<b>1.4 Traitements des pathologies articulaires chez le cheval.....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Les anti inflammatoires .....	16
1.4.2 Les compléments alimentaires.....	17
<b>1.5 Objectif de l'étude .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Schéma expérimental .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Animaux et nutraceutique .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Examen orthopédique .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Culture de chondrocytes .....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Préparation des solutions enzymatiques et des milieux de culture .....	22
2.4.2 Récupération du cartilage .....	22
2.4.3 Digestion enzymatique .....	23
2.4.4 Mise en culture des chondrocytes.....	23
2.4.5 Stimulation à l'interleukine 1-β.....	23
<b>2.5 Extraction nucléaire .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Préparation des solutions .....	24
2.5.2 Méthode d'extraction.....	24
<b>2.6 La zymographie .....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Principe.....	25
2.6.2 Préparation des solutions et réactifs .....	25
2.6.3 Préparation des échantillons et des standards pour l'électrophorèse .....	26
2.6.4 Préparation de l'électrophorèse .....	26
2.6.5 Préparation du gel de séparation (running gel) .....	27
2.6.6 Préparation du gel de compression (stacking gel) .....	27
2.6.7 Migration des échantillons .....	27
2.6.8 Incubation des gels .....	27
2.6.9 Coloration et décoloration des gels .....	27
2.6.10 Quantification de l'activité MMP.....	28
<b>2.7 La technique Trans-AM (Transcription factor ELISA assay) .....</b>	<b>28</b>
2.7.1 Principe.....	28
2.7.2 Préparation des solutions .....	28
2.7.3 Dosage protéique des extraits nucléaires par la méthode Bradford .....	28
2.7.4 Fixation des extraits nucléaires.....	28
2.7.5 Fixation de l'anticorps primaire .....	29
2.7.6 Fixation de l'anticorps secondaire .....	29

<b>2.8 Immunofluorescence de p65 dans les chondrocytes équins .....</b>	<b>29</b>
2.8.1 Principe.....	29
2.8.2 Préparation des solutions .....	29
2.8.3 Culture de chondrocytes .....	29
2.8.4 Fixation et perméabilisation des cellules.....	30
2.8.5 Immunomarquage.....	30
2.8.6 Marquage des noyaux.....	30
2.8.7 Montage des lames et révélation .....	30
2.9 Analyse statistique des données .....	30
<b>3. Résultats.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Tests de flexions .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Quantification de l'activité MMP-2 dans le liquide synovial .....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Standardisation par rapport au volume de synovie .....	32
3.2.2 Standardisation par rapport au à la concentration en protéines synoviales.....	34
<b>3.3 Quantification de l'activité MMP-2 dans les surnageants .....</b>	<b>36</b>
3.3.1 Concentration en protéines totales des chondrocytes et des surnageants .....	36
3.3.2 Standardisation par rapport à la concentration protéique des chondrocytes .....	37
3.3.3 Standardisation par rapport à la concentration en protéine des surnageants.....	38
<b>3.4 Quantification de NF-<math>\kappa</math> actif dans les extraits nucléaires .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 Immunofluorescence de p65 .....</b>	<b>41</b>
<b>4. Discussion, conclusion et perspectives .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Examens orthopédiques .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Quantification de l'activité MMP-2 .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Quantification de NF-<math>\kappa</math>B activé.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Conclusion et perspectives .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Bibliographie .....</b>	<b>48</b>

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
ARN	Acide ribonucléique
AP-1	Activator protéin-1
BSA	Bovine albumin serum
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
COX	Cyclo-oxygénase
CS	Chondroïtine sulfate
EMSA	Electromobility shift assay
FBS	Fetal bovine serum
GAG	Glycosaminoglycanes
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GS	Glucosamine
HA	Acide hyaluronique
IGF-1	Insulin growth factor-1
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	Interleukine
iNOS	Inducible nitric oxyde synthase
I $\kappa$ B	Inhibitor kappaB
KS	Kératane sulfate
LRR	Leucin rich repeats
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéases matricielles
MT-MMP	Membrane-type MMP
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappaB
NIK	NF- $\kappa$ B inducing kinase
NO	Nitric oxyde
OA	Ostéoarthrite
PSGAG	Polysulfated glycosaminoglycan
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RT-PCR	Real-time PCR
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SLRP	Small leucin rich-proteoglycan
TAK-1	Transforming growth factor-activated kinase 1
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TIMP	Tissue inhibitors of MMP
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$

## 1. Introduction

Une articulation en pleine santé est un élément essentiel dans la vie de l'athlète équin. Néanmoins, leur sollicitation exacerbée dans le cadre du sport conduit inévitablement à l'apparition de pathologies articulaires très invalidantes telle que l'ostéoarthrite. Le cheval, diminué dans ses performances, se voit dès lors contraint à une réforme anticipée.

Bien que les anti-inflammatoires stéroïdiens et non-stéroïdiens représentent le moyen thérapeutique le plus répandu dans le traitement des pathologies articulaires, leur administration à long terme s'accompagnent généralement d'effets secondaires non désirés (ulcères gastriques, toxicité rénale, thrombose vasculaire, etc.). De plus, l'utilisation de certaines molécules comme le diclofenac ou l'indométhacine favorise la production de métalloprotéases matricielles (MMP) contribuant à la poursuite du processus pathologique (Ito *et al.*, 1995 ; Clegg, 1998). Enfin, l'utilisation de ces molécules durant les compétitions sportives est strictement interdite. Devant l'inefficacité de ces traitements, la mise au point de nouveaux moyens thérapeutiques se révèle nécessaire.

Depuis quelques années, sont apparus sur le marché un nouveau type d'agents thérapeutiques que sont les nutraceutiques. Ces compléments alimentaires à base, généralement, de glucosamine et de chondroïtine sulfate ont déjà démontré une certaine efficacité vis-à-vis des pathologies articulaires tant *in vivo* que *in vitro*. Cependant, l'extrapolation des données de l'*in vitro* vers l'*in vivo* demeure une étape encore difficile à établir et l'effet d'une complémentation *in vivo* sur l'activité des métalloprotéases matricielles synoviales n'a pas encore été vérifiée. Dès lors, l'objectif de ce mémoire est d'investiguer cette question chez le cheval.



## 1.1 Articulation saine

L'articulation saine, ou diarthrose, est une structure complexe composée de divers éléments en interaction tels que la capsule articulaire, les ligaments, le cartilage articulaire et l'os sous-chondral (Fig.1). Ensemble, ces éléments assurent le mouvement des os au niveau de leurs surfaces articulaires recouvertes de cartilage hyalin et maintenues en contact par des ligaments. Entourée par ces derniers, la capsule articulaire délimite un espace autour des épiphyses dont la face interne, composée de synoviocytes, participe à l'élaboration d'un fluide lubrifiant : la synovie (Jones *et al.*, 2008).

### 1.1.1 Constituants d'une articulation

#### 1.1.1.1 La capsule articulaire

Un tissu fibreux dense ainsi qu'une membrane synoviale constituent l'ensemble de la capsule articulaire. Associée aux ligaments, la partie fibreuse assure la stabilité et le maintien de l'articulation. Elle est principalement composée de fibres de collagène de type I.

D'origine mésenchymateuse, la membrane synoviale équine est composée d'une intima et d'une subintima (ou subsynoviale). Ses fonctions sont multiples. En tant que barrière semi-perméable, elle régule le contenu en protéine et en acide hyaluronique du liquide synovial. Sur base de la composition de la subintima, on distingue ainsi les membranes synoviales de types aréolaires, fibreuses et adipeuses. La membrane synoviale aréolaire comprend une intima épaisse ainsi qu'une subintima hautement vascularisée. Le type adipeux se distingue quant à lui par une intima fine, constituée d'une couche de cellules aplaties et par la présence de cellules adipeuses dans la subintima. Enfin, les membranes synoviales de type fibreuses se caractérisent par une fine couche de cellules en contact direct avec le tissu fibreux dense sous-jacent (McIlwraith, 2001 ; Iwanaga *et al.*, 2000).

L'intima contient deux types de synoviocytes, le type A (macrophagique) et le type B (fibroblastique). Les synoviocytes de type A apparaissent comme des cellules rondes et sont localisées dans la partie superficielle de l'intima en contact avec la cavité synoviale. Spécialisées dans la capture et la dégradation de molécules extracellulaires (débris cellulaires, microorganismes, antigènes), ces cellules présentent un cytoplasme riche en lysosomes mais le réticulum endoplasmique rugueux (RER) y est très peu développé. Par leur action, les synoviocytes de type A peuvent modifier le contenu protéique du liquide synovial.

Les couches cellulaires situées plus en profondeur sont constituées de synoviocytes dendritiques de type B. Spécialisées dans la synthèse et dans la sécrétions de protéines (collagènes, fibronectines, acide hyaluronique et glycosaminoglycanes) ces cellules possèdent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé ainsi qu'un RER fortement développé. Ce sont ces cellules qui assurent le contrôle dans la composition du liquide synovial (Iwanaga *et al.*, 2000).

### *1.1.1.2 L'os sous-chondral*

L'os sous-chondral correspond à une zone de transition localisée entre le cartilage articulaire et le tissu osseux spongieux. On y retrouve la plaque sous-chondrale ainsi que l'os trabéculaire sous-chondral. Doué d'une certaine capacité de déformation, l'os sous-chondral amortit, répartit et transmet la charge aux couches de l'os situées plus en profondeur (Kawcak *et al.* 2001).

### *1.1.1.3 Le cartilage articulaire*

#### *A. Morphologie et histologie*

Chez le cheval, le cartilage articulaire est principalement de type hyalin. Dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, le tissu présente un aspect opaque et laiteux. D'un point de vue histologique, quatre couches sont identifiées :

**La couche superficielle**, où les chondrocytes apparaissent comme des cellules ovoïdes ou aplaties. Les fibres de collagène y sont orientées de manière tangentielle par rapport à la surface du cartilage.

**La couche intermédiaire**, où les chondrocytes, plus larges, sont présents seuls ou groupés par deux. Les fibres de collagènes sont disposées manière aléatoire dans cette partie du cartilage.

**La couche profonde**, où les chondrocytes sont organisés en colonnes séparées entre elles par des fibres de collagène orientées perpendiculairement à la surface du cartilage.

**La couche calcifiée**, où les chondrocytes, peu nombreux, présentent divers stades de dégénération.

Du fibrocartilage est éventuellement observé au niveau des zones de transition (aux jonctions entre le cartilage articulaire, la membrane synoviale et le périoste) (McIlwraith, 2001).

#### *B. Composition*

##### *B.1 Les chondrocytes*

Unique type cellulaire du cartilage, les chondrocytes occupent moins de 5% du volume total. D'un point de vue morphologique, ces cellules spécialisées dans la synthèse et la sécrétion apparaissent rondes avec un Golgi et un RER développé. Le cytoplasme est riche en granules de glycogène et en gouttelettes lipidiques.

Les chondrocytes sont responsables de la croissance osseuse ainsi que du maintien des constituants de la matrice extracellulaire. Isolés dans une matrice extracellulaire abondante et avasculaire, l'approvisionnement des cellules en nutriments est assuré par diffusion depuis la surface. Etant donné que la tension en oxygène y est très faible, les mitochondries sont peu abondantes dans les chondrocytes et l'essentiel de l'énergie provient de la glycolyse (Archer, 2003).

## B.2 La matrice extracellulaire

Principalement constituée d'eau et de collagène (Fig.2), la matrice extracellulaire (MEC) du tissu cartilagineux comprend également une quarantaine de protéines non-collagéniques dont les protéoglycanes et les glycoprotéines. Bien que ces protéines soient, pour la plupart, synthétisées par les chondrocytes, l'origine de certaines (chondromoduline, lysosyme) demeure encore inconnue (Roughley, 2001).

### B.2.1 Les collagènes

Le terme « collagène » désigne toute protéine qui présente une structure supramoléculaire sous la forme d'une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques. La famille des collagènes montre une très grande diversité tant dans leur structure que dans leur fonction, leur contenu en domaines additionnels ou encore leur localisation tissulaire (Gelse *et al.*, 2003). On distingue cependant une caractéristique commune entre eux, c'est-à-dire, une triple hélice droite composée de trois chaînes  $\alpha$  résultant de la répétition d'un motif Gly-X-Y. Dans la plupart des cas, X est une proline et Y, une hydroxyproline favorisant la glycosylation de la protéine (Cremer *et al.*, 1998). Les chaînes polypeptidiques peuvent être soit identiques comme c'est le cas pour les collagènes II, III, VII, VIII, X (on parlera dès lors d'homotrimère) ou soit différentes (hétérotrimère) comme pour les collagènes I, IV, V, VI, IX et XI (Gelse *et al.*, 2003).

Dans le cartilage articulaire, les collagènes suivants ont pu être identifiés : II, III, VI, IX, X, XI, XII, XIV et XVI. Le collagène de type II est le plus abondant puisqu'il représente environ 80% du collagène total tandis que les collagènes de type IX et XI ne représentent que 15%. Enfin, les collagènes de type III, VI, XII et XVI correspondent aux 5% restants (Aigner and Stove, 2003).

Le collagène de type XI, associé au collagène de type II, semble impliqué dans la régulation de la taille et du diamètre des fibrilles de collagène. Le collagène de type IX, disposé de manière périodique le long des fibrilles de collagène de type II, assurerait quant à lui le rôle d'intermédiaire entre la matrice fibrillaire et les autres protéines non-collagéniques via son domaine globulaire N-terminal (Aigner and Stove, 2003 ; Cremer *et al.*, 1998). De même, les collagènes de type XII et XIV semblent également jouer ce rôle d'intermédiaire puisqu'ils appartiennent au même groupe que le collagène de type IX (Eyre, 2002). La fonction du collagène de type XVI demeure encore inconnue. Le collagène de type VI est abondant dans la zone de la matrice extracellulaire située à proximité des chondrocytes (zone péricellulaire). Capable de se lier aux intégrines membranaires et aux protéines non collagéniques (décorines, fibromoduline, etc.), cette protéine semble jouer le rôle d'interface entre les chondrocytes et la charpente fibrillaire. Il est dès lors probable que le collagène de type VI serait impliqué dans l'ancrage des cellules à la MEC ainsi que dans la signalisation cellulaire (Aigner and Stove, 2003).

### B.2.2 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes présentent une grande diversité tant dans leur taille que dans leur structure et leur fonction. Cette diversité provient des glycosaminoglycanes (GAG) liés de manière covalente au niveau de sites consensus contenus dans la protéine centrale (core protein) (Dudhia, 2005). On distingue dès lors les protéoglycanes suivants :

#### B.2.2.1 Les aggrécanes

Protéoglycanes majeurs du cartilage hyalin, les aggrécanes s'associent à l'acide hyaluronique ou à des protéines de liaison générant de larges complexes multimoléculaires ( $10^8$ - $10^9$  Da). Chaque molécule d'aggrécane est composée de trois domaines globulaires G1, G2, G3 séparés entre eux par des domaines interglobulaires (Fig.3a) (Kiani *et al.*, 2002). Cependant, le domaine interglobulaire séparant G2 à G3 possède une spécificité qui le distingue du domaine séparant G1 à G2. En effet, ce dernier possède un domaine de liaison au kératane sulfate (KS) et deux domaines de liaison au chondroïtine sulfate (CS) permettant une interaction avec plus d'une centaine de molécules de CS et de KS. Le contenu élevé de ces GAG anioniques induit un afflux d'eau dans la MEC (la proportion d'eau dans le cartilage peut atteindre 70%). Un gel hydraté se forme alors conférant les propriétés biomécaniques du cartilage (Roughley, 2001 ; Dudhia, 2005).

#### B.2.2.2 Les small leucin-rich protéoglycanes (SLRP)

Ces protéoglycanes sont présents dans le cartilage en moindre proportion que les aggrécanes. Ils assurent néanmoins le maintien de l'intégrité du tissu cartilagineux et régulent son métabolisme. Parmi les principales SLRP qui constituent le cartilage, on distingue les decorines, les biglycanes, les fibromodulines et les lumicanes. Au niveau structure (Fig.3b), chaque SLRP possède un noyau central constitué de 10 domaines contenant des motifs riches en leucine (LRR). La différence entre les SLRP se situe au niveau des GAG liés au noyau central : les decorines et les biglycanes possèdent en position N-terminale des sites de liaison au dermatane sulfate tandis que les fibromodulines et les lumicanes possèdent des sites de liaison au kératane sulfate entre les domaines riches en LRR (Roughley, 2006).

### B.2.3 Les glycoprotéines

Bien que ces protéines ne représentent qu'une petite proportion du cartilage, elles sont néanmoins importantes puisque certaines interviennent dans l'orientation des fibrilles de collagène et des agrégats de protéoglycanes tandis que d'autres assurent l'ancrage des chondrocytes à la MEC. Parmi ces dernières, on retrouve les protéines de liaison, les protéines COMP (cartilage oligomeric matrix protein), la chondronectine, la fibronectine, la thrombospondine et l'ancrine C-II (Neame *et al.*, 1999 ; McIlwraith, 2001).

## **1.2 Les pathologies articulaires chez le cheval**

Les pathologies articulaires dégénératives sont fréquentes chez le cheval. Aboutissant à terme à la destruction du cartilage articulaire, elles compromettent sérieusement la carrière sportive de l'athlète équin. La compréhension de chaque étape du processus pathologique est dès lors nécessaire pour la mise au point d'un diagnostic précoce et d'un traitement adapté (Goodrich and Nixon, 2006).

### **1.2.1 Ostéochondrose**

L'ostéochondrose est une pathologie rencontrée aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Elle consiste, de manière générale, en une altération de l'ossification enchondrale chez les jeunes individus. Les chondrocytes, maintenus dans un état pré-hypertrophique, continuent de se multiplier et induisent une croissance continue du cartilage qui s'épaissit. La composition de la matrice extracellulaire s'en retrouve modifiée si bien que la minéralisation et la néovascularisation du tissu est impossible. Suite à ce manque d'apport nutritif, les chondrocytes entrent en apoptose générant une destruction tissulaire dans le cartilage de croissance. Au bout d'un temps, des fissures apparaissent et rejoignent le cartilage articulaire qui, fragilisé, libère des lambeaux cartilagineux qui auront un effet pro-inflammatoire dans la cavité synoviale. La prévalence de la maladie est élevée chez le cheval puisqu'elle équivaut environ à 14%. Une croissance rapide, l'hérédité, un trauma ou encore le régime alimentaire déséquilibré sont autant de facteurs favorisant le développement de l'ostéochondrose (Jeffcott *et al.*, 1998 ; Ytrehus *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Ostéoarthrite**

L'ostéoarthrite (OA) est la forme d'arthrite la plus fréquemment diagnostiquée chez les individus atteints de pathologies articulaires. Bien que son étiologie exacte reste encore inconnue, de nombreux facteurs biomécaniques (trauma, configuration inadaptée de l'articulation, etc.) et biochimiques (cytokines, protéases, etc.) semblent néanmoins prédisposer les individus à cette pathologie (Hedbom and Häuselmann, 2002 ; Abramson, 2008). Elle représente également la cause majeure de boiterie chez les athlètes équins (Todhunter and Lust, 1992). En effet, les stress mécaniques imposés par l'entraînement et les compétitions sportives sont souvent les facteurs qui initient le processus pathologique (Kim *et al.*, 2003).

L'ostéoarthrite ne se limite pas seulement au cartilage articulaire : l'os sous-chondral et la membrane synoviale en sont également atteints et présentent, tout comme le cartilage, des modifications. L'hyperplasie, l'hypertrophie et l'infiltration de leucocytes sont les caractéristiques d'une membrane synoviale ostéoarthritique (Krasnokutsky *et al.*, 2007). Sous l'effet de facteurs de croissance tels que le transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et l'insuline growth factor-1 (IGF-1), l'os sous-chondral ostéoarthritique s'épaissit et des nodules osseux (les ostéophytes) apparaissent à proximité de l'articulation (Sandell *et al.* 2001).

La production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) par les chondrocytes ostéoarthriques constitue un événement clé dans la destruction du cartilage articulaire. Sous leur influence, les chondrocytes procèdent non seulement à la surexpression de protéinases spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéases matricielles (MMP) (Clegg *et al.*, 1997), mais aussi à la surexpression d'enzymes impliquées dans la synthèse de médiateurs inflammatoires secondaires tels que le NO et les prostaglandines. Par leur action paracrine et autocrine sur les chondrocytes et synoviocytes environnants, ces médiateurs entretiennent le processus inflammatoire et accélèrent de la sorte la destruction du cartilage (Hedbom and Häuselmann, 2002). En effet, certaines études ont déjà démontré que le NO inhibe la synthèse de protéoglycanes et de collagènes, favorise la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-18 et enfin, induit l'apoptose des chondrocytes par son association avec certaines espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde (Abramson, 2008).

### 1.3 Les métalloprotéinases matricielles

#### 1.3.1 Généralités

Acteurs principaux dans la dégradation de la matrice extracellulaire, ces enzymes appartenant à la famille des endopeptidases zinc-dépendantes se divisent en six groupes sur base de leur spécificité de substrat et leur structure (Clark *et al.*, 2008 ; Hijoja, 2005) :

**Collagénases** (MMP-1, -8, -13 et MMP-18) clivent le collagène de type I, II et III. Le site de clivage se situe soit entre une glycine et une isoleucine (collagène de type I) ou une glycine et une leucine (collagène de type II) (Krane and Inada, 2008).

**Stromelysines** (MMP-3, -10, -11 et MMP-12) dégradent de nombreux substrats comme les protéoglycanes, le collagène de type IV et V, les peptides terminaux du collagène de type II, la fibronectine et la laminine (Birdekal-Hansen *et al.*, 1993).

**Matrilysines** (MMP-7 et MMP-26) ne possèdent pas de domaines hemopexines. En plus de pouvoir dégrader des constituants de la matrice extracellulaire, elles sont capables de cliver de nombreuses molécules localisées en surface cellulaire comme le Fas-ligant et les E-cadhérines (Nagase *et al.*, 2006).

**Membrane type-MMP** (MMP-14, -15, -16, -17, -24 et MMP-25) participent toutes à l'activation de la pro-MMP2 (excepté la MT4-MMP). Les MMP-14, -15, -16 et -24 sont des protéines transmembranaires de types 1 tandis que les MMP-17 et MMP-25 sont ancrées en membrane via des ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Visse and Nagase, 2003).

**Gélatinases** (MMP-2 et MMP-9). La MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B) sont produites par de nombreux types cellulaires parmi lesquels on retrouve les chondrocytes, les synoviocytes et les cellules immunitaires (les monocytes, les macrophages tissulaires et les polymorphonucléaires) (Arican *et al.*, 2000 ; Clegg *et al.*, 1997). Une fois sécrétée, la capacité de la MMP-9 à cliver le collagène de type IV des membranes basales et les gélatines permet aux cellules de l'immunité d'accéder ou de quitter la circulation sanguine pour atteindre le site inflammatoire (Ram *et al.*, 2006).

**Autres MMP** regroupent les MMP qui ne peuvent être classés dans les autres catégories (MMP-19, -20, -21, -23 et MMP-28) (Nagase *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Structure moléculaire des MMP

Toutes les MMP partagent une structure commune (Fig.5) comprenant un pré-domaine, un pro-domaine, un domaine catalytique et un domaine C-terminal. Le pré-domaine intervient dans la sécrétion de la protéine tandis que le pro-domaine maintient la protéine inactive par une interaction de type  $\text{Zn}^{2+}$ -Cystéine. Le domaine catalytique comprend une séquence HEXGHXXGXXH caractéristique permettant la liaison de l'atome de zinc. Enfin, le domaine C-terminal ou « haemopexine-like domain » intervient quant à lui probablement dans la reconnaissance du substrat et dans l'interaction avec d'éventuels inhibiteurs.

A cette structure de base peuvent également s'ajouter d'autres domaines qui confèrent une certaine spécificité à l'enzyme. Les domaines trans-membranaires et les ancres GPI des MT-MMPs permettent un ancrage en membrane tandis que les domaines « fibronectin-like » des MMP-2 et MMP-9 assurent la liaison à la gélatine (Nagase *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Régulation de l'activité MMP

#### 1.3.3.1 Activation du pro-enzyme

Les metalloprotéinases matricielles sont synthétisées sous la forme de pré-pro-enzymes. Dès leur entrée dans le réticulum endoplasmique, le pré-domaine est clivé générant alors un zymogène (pro-enzyme). Pour la plupart des MMP, l'action de protéases telles que la trypsine, plasmine ou furine induit le clivage du pro-domaine. D'autres MMP s'activent mutuellement : le recrutement en membrane de la pro-MMP-2 induit son activation par le clivage du pro-domaine par les MT-MMP (Hijova, 2005). L'activation du pro-enzyme peut aussi se produire de manière artificielle : un traitement avec des composés organiques mercurés, des ions métalliques, des agents oxydants ou chaotropiques (KI, NaSCN) induit une rupture de la liaison  $\text{Zn}^{2+}$ -Cystéine (Fig.6) (Birdekal-Hansen *et al.*, 1993).

#### 1.3.3.2 Régulation transcriptionnelle des MMP

Les inducteurs de l'expression des gènes MMP sont multiples. Les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), les facteurs de croissance (EGF, bFGF), les interactions de type cellule-cellule et cellule-constituants de la matrice extracellulaire sont autant de stimuli capables de réguler la transcription des gènes MMP (Hijova, 2005).

La liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur (IL-1RI) induit le recrutement en membrane de MyD88, une protéine adaptatrice, et de la kinase IRAK (Fig.7). Par son interaction avec TRAF6, cette dernière recrute et active la kinase TAK1 (Transforming growth factor-activated kinase 1), une MAP3K (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999) qui déclenche alors deux voies de signalisation :

### A. La voie de signalisation MAPK-AP-1

TAK1 induit la phosphorylation de la MAP2K qui, une fois active, phosphoryle la kinase terminale JNK. Activée, cette dernière entraîne l'activation d'un facteur de transcription, l'activator protein-1 (AP-1) (Hoffmann *et al.*, 2005). Cette protéine est ensuite transloquée dans le noyau où, par liaison au niveau de site consensus contenus dans le promoteur, elle va contribuer à la transcription des MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13, -19 et MMP-26 (Firestein *et al.*, 1999 ; Clark *et al.*, 2008). Les MMP-2, -8, -11, -14, -21 et MMP-28 ne disposent pas de sites AP-1 suggérant que leur expression se produit de manière constitutive (Vincenti and Brinckerhoff, 2007).

### B. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B

TAK1 induit également la voie de signalisation NF- $\kappa$ B : elle favorise l'auto-activation la protéine NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) en phosphorylant la partie N-terminale de la protéine (Ninomiya-tsuji *et al.* 1999). En activant le complexe I $\kappa$ B kinase (IKK), NIK induit l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription dimérique et ubiquitaire constitué, le plus souvent, des sous-unités p65 et p50 (Firestein *et al.*, 1999). Chez le cheval, il semble néanmoins que NF- $\kappa$ B extrait des cellules immunitaires soit constitué principalement d'homodimères p65 et, dans une moindre mesure, d'homodimères p50 (Sandersen *et al.*, 2001). D'autres sous unités comme c-Rel, RelB et p52/p100 existent et, à l'instar de p65 et p50, peuvent s'associer pour générer des homo- ou hétérodimères (Bureau *et al.*, 2000 ; Shakibaei *et al.*, 2007).

NF- $\kappa$ B est présent dans le cytosol mais il est maintenu dans un état inactif par association avec son inhibiteur, I $\kappa$ B. Lorsque NIK est activée par phosphorylation, elle induit l'activation du complexe IKK, un complexe macro-moléculaire résultant de l'association des kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , ainsi que des protéines adaptatrices IKK $\gamma$  et NEMO (Verma *et al.*, 2003). Ce complexe phosphoryle, via IKK $\beta$ , la sous unité I $\kappa$ B au niveau de deux résidus sérine N-terminaux. Ces résidus marqués sont ensuite reconnus par une ubiquitine E3 ligase qui procède, finalement, à l'ubiquitination des résidus lysines adjacents en vue d'une dégradation de I $\kappa$ B par le protéasome 26S (Beinke *et al.*, 2004). Libéré de son inhibiteur, NF- $\kappa$ B entre dans le noyau de la cellule, se lie à l'ADN au niveau de sites consensus spécifiques contenus dans les promoteurs de gènes en relation avec l'inflammation et enfin, induit leur expression (Sandersen *et al.*, 2001). Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes de la MMP-1 et de la MMP-13. En effet, plusieurs études ont déjà démontré la nécessité de NF- $\kappa$ B pour induire leur expression (Mengshol *et al.*, 2000 ; Vincenti and Brinckerhoff, 2001).



### 1.3.3.3 L'inhibition de l'activité protéolytique

#### A. Les TIMP (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*)

Les TIMP sont des protéines sécrétées qui, par liaison non-covalente aux MMP suivant une stœchiométrie 1 :1, induisent l'inhibition de l'activité MMP (Hijova, 2005). A l'heure actuelle, quatre TIMP différents ont été identifiés chez les mammifères (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4). Ces molécules, d'un poids compris entre 21 et 29 kDa, possèdent une structure commune divisée en deux domaines (Baker *et al.*, 2002 ; Visse and Nagase, 2003). On retrouve ainsi un domaine N-terminal, responsable de l'activité inhibitrice des MMP, et un domaine C-terminal dont la séquence, très variable selon les TIMP, conférerait probablement une certaine spécificité à la molécule (Handsley *et al.*, 2005).

Outre l'inhibition des MMP, les TIMP possèdent d'autres fonctions biologiques. Les TIMP-1 et -2 favorisent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose *in vitro* tandis que le TIMP-3 semble avoir l'effet inverse. De plus, certains TIMP possèdent une fonction bien à l'opposé de leur fonction d'inhibition puisqu'ils facilitent l'activation de certaines MMP : L'activation de la MMP-2 se retrouve accélérée par la présence en faible quantité de TIMP-2. Associée à son inhibiteur, le complexe est recruté en membrane où une MT-MMP procède au clivage du pro-domaine (Hijova, 2005).

## 1.4 Traitements des pathologies articulaires chez le cheval

### 1.4.1 Les anti inflammatoires

Etant donné la composante inflammatoire que comportent les pathologies articulaires dégénératives, une approche thérapeutique à base d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) semblerait appropriée : en inhibant l'enzyme principale de la voie de l'acide arachidonique, la COX2, la biosynthèse des PGE<sub>2</sub> et PGI<sub>2</sub> pro-inflammatoires s'en retrouve altérée. Mais leur administration suscite néanmoins de nombreux problèmes, puisque leur usage dans le cadre de compétitions sportives chez le cheval est strictement interdite et que leur administration à long terme s'accompagne d'effets secondaires non désirés (ulcères gastriques, lésion intestinales, insuffisance rénale, etc.) (Goodrich and Nixon, 2006).

Une étude menée *in vitro* par Ito *et al.* montre que des chondrocytes et synoviocytes de lapins traités avec de l'indométhacine ou du diclofenac génèrent une plus grande quantité de MMP-9, ce qui tend à confirmer ce que l'on observe *in vivo* (Ito *et al.*, 1995). En effet, des études menées sur des modèles d'animaux ostéoarthriques montrent que la prise de certains AINS comme l'aspirine, l'indométhacine, le naproxen ou le diclofenac induisent une aggravation du processus pathologique (diminution de la synthèse de protéoglycanes dans la MEC, augmentation du contenu en eau) (Ding, 2002).

Enfin, bien que les prostaglandines soient des molécules pro-inflammatoires, certaines comme les PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub> interviennent également dans la résolution du processus puisqu'elles favorisent la synthèse des lipoxines, molécules aux effets « pro-resolving ». En stimulant avec de l'IL-1 $\beta$  des synoviocytes humains traités avec des lipoxines, on observe une diminution dans la production de l'IL-6, de l'IL-8 et de la MMP-3 (Yacouban and Serhan, 2007). Ito *et al.* ont par ailleurs démontré *in vitro* que les PGE<sub>2</sub> induisent une inhibition dans la production de la pro-MMP-9 (1995).

### 1.4.2 Les compléments alimentaires

Face à l'inefficacité des moyens thérapeutiques classiques à enrayer le processus de dégradation du cartilage, des alternatives ont vu le jour avec l'arrivée des nutraceutiques sur le marché. Ces compléments nutritionnels ont l'avantage d'être dépourvus d'effets secondaires et comprennent généralement des précurseurs des constituants du cartilage articulaire tels que la glucosamine, le chondroïtine sulfate ou encore l'acide hyaluronique. Un traitement à base de ces nutraceutiques prévient, retarde l'apparition de l'OA ou induit la réparation des lésions cartilagineuses suite cette même pathologie (Goodrich and Nixon, 2006).

#### 1.4.2.1 La glucosamine

La glucosamine (GS) est un monosaccharide aminé (Fig.8a), élément de base de la chitine constituant l'exosquelette des crustacés. Administrée à l'organisme, la GS est convertie en UDP-*N*-acétylglucosamine qui servira plus tard à la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) du cartilage tels que l'acide hyaluronique (HA) (Piperno *et al.*, 2000 ; Hungerford *et al.*, 2003 ; Goodrich and Nixon, 2006).

Bien que le mécanisme d'action de la glucosamine reste encore inconnu, il a été démontré *in vitro* qu'elle exerce de nombreuses actions sur les chondrocytes (Tiku *et al.*, 2006). Parmi celles-ci on dénotera l'augmentation de la synthèse protéique (Piperno *et al.*, 2000), l'inhibition de la synthèse de la MMP-3 (Dodge and Jimenez, 2003), l'inhibition de l'expression et de la synthèse de la COX-2 ainsi que l'inhibition de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B après stimulation à l'IL-1 $\beta$  (Gouze *et al.*, 2002 ; Largo *et al.*, 2003).

Différentes formes de glucosamine sont disponibles en médecine telles que la glucosamine hydrochlorée, la glucosamine sulfate ou encore la *N*-acétyl-D-glucosamine. La biodisponibilité diffère cependant suivant la forme utilisée. En effet, une étude menée par Meulyzer *et al.* chez le cheval montre que la glucosamine sulfate administrée *per os* présente une biodisponibilité significativement supérieure à celle de la glucosamine hydrochlorée (9,4% et 6,1% respectivement) (Meulyzer *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.2 Le chondroïtine sulfate

Le chondroïtine sulfate est un glycosaminoglycane présent dans de nombreux tissus et résultant de la répétition d'un motif dissaccharidique d'acide-D-glucuronique et de D-*N*-acétylgalactosamine (Fig.8b). Le haut degré d'hydratation du chondroïtine sulfate contenu dans les protéoglycanes confère au cartilage ses propriétés élastiques (Legendre *et al.*, 2008).

Etant donné son poids moléculaire élevé, il est peu probable que le chondroïtine sulfate administré *per os* traverse la barrière intestinale tel quel. Les enzymes dégradatives (sulfatases, exoglycosidases) y sont nombreuses et, une fois absorbés, on suggère que les produits de dégradations du chondroïtine sulfate métabolisés dans le foie génèrent des unités dissaccharidiques qui seront libérés, plus tard, dans la circulation sanguine. La biodisponibilité de la molécule semble se situer entre 22 et 32% chez le cheval (Eddington *et al.*, 2001 ; Goodrich and Nixon, 2008).

Tout comme la glucosamine, le mécanisme d'action du chondroïtine sulfate est inconnu. Cependant, de nombreuses études *in vitro* démontrent un effet bénéfique d'un traitement

de chondrocytes au chondroïtine sulfate. On observe ainsi une diminution dans l'expression de protéases matricielles (MMP-1, MMP-3 et -13, aggrecanases-1 et -2) après stimulation à l'IL-1 $\beta$ . L'expression de la COX-2 s'en retrouve altérée également et corrèle avec la diminution dans la production de PGE<sub>2</sub> observée. Bien que l'expression de la nitrique oxyde synthase (iNOS) est diminuée, la production de NO ne semble pas affectée par un traitement au chondroïtine sulfate. La synthèse protéique s'en retrouve, quant à elle, améliorée puisque l'on constate une hausse de la synthèse de GAG et une quantité de mRNA correspondant aux aggrecanes accrue (Legendre *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.3 L'acide hyaluronique

Élément structural du cartilage, l'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane résultant de la répétition d'un motif dissacharidique d'acide D-glucuronique et de *N*-acétylglucosamine (Fig.8b). De part ses propriétés visco-élastiques uniques, cette molécule présente en abondance dans le liquide synovial confère à ce dernier son rôle de lubrifiant et d'absorbeur de chocs.

L'acide hyaluronique possède également un rôle en tant que molécule de signalisation mais semble avoir des effets opposés sur les cellules suivant son poids moléculaire. En effet, si l'acide hyaluronique à bas poids moléculaire agit en tant que signal pro-inflammatoire, l'acide hyaluronique à haut poids moléculaire possède, quant à lui, des propriétés anti-inflammatoires (Waddell *et al.*, 2007). *In vitro*, un traitement de chondrocytes à l'acide hyaluronique induit, après stimulation à l'IL-1 $\beta$ , une inhibition de l'expression de NF- $\kappa$ B et de l'activité des MMP-2 et -9 (Karna *et al.*, 2008). *In vivo*, un tel traitement chez le cheval induit une atténuation des boiteries et le cartilage présente une épaisseur plus importante (Goodrich and Nixon, 2006).

#### 1.4.2.4 L'*Harpagophytum procumbens*

Dénommée aussi « griffe du diable », cette plante herbacée de la famille des Pedaliacées et originaire de l'Afrique de Sud est connue des indigènes pour ses propriétés anti-inflammatoires. Il s'agit d'une plante pérenne, aux feuilles disposées de manière opposées et aux fleurs tubulaires violacées (Fig.9). Le fruit apparaît comme une capsule garnie d'aiguillons armés de crochets acérés dont la dispersion est assurée par la fixation du fruit dans la partie molle du sabot du bétail (*Harpagophytum* signifie « harpon végétal »).

Importée en Europe durant la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, l'*Harpagophytum procumbens* est depuis régulièrement utilisée comme agent thérapeutique. En effet, les extraits préparés à partir de la racine secondaire montrent une certaine efficacité dans le traitement de la fièvre, de la dyspepsie, des douleurs musculo-squelettiques et rhumatismales. D'autres études dénoteraient un effet sur l'arythmie cardiaque ou la pression sanguine (Gagnier *et al.*, 2004 ; Stewart *et al.*, 2005).

Bien que leur mécanisme d'action reste encore inconnu, les iridoïdes (harpagosides, harpagides et procumbides) contenus dans les extraits d'*Harpagophytum procumbens* sont considérés comme les acteurs de l'effet anti-inflammatoire. Ainsi, une étude menée récemment par Qi *et al.* démontre un effet inhibiteur d'une dizaine composés extraits sur la flambée respiratoire (oxidative burst) des macrophages (2006). De plus, un traitement *in vitro* de cellules Hep62 et de macrophages avec des harpagosides induit une inhibition de l'expression de la COX-2, de l'iNOS ainsi qu'un blocage de la translocation de NF- $\kappa$ B

dans les noyaux des cellules (Huang *et al.*, 2005). Enfin, une étude menée par Schulze-Tanzil et ses collaborateurs montre qu'un traitement de chondrocytes avec d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* diminue de manière significative la production des MMP-1, -3 et -9 (Schulze-Tanzil *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.5 Les insaponifiables

Les huiles extraites à partir de l'avocat et du soja contiennent des composés actifs référés sous le terme de lipides insaponifiables (ASU ; Advocat/Soy Unsaponifiable). Les constituants majeurs de ces lipides comprennent toute une série de phytostérols (beta-sitosterol, le campesterol et le stigmasterol) aux effets anti-oxydants, analgésiques et anti-inflammatoires potentiels (Lipiello *et al.*, 2008).

Une étude, menée par Au et ses collaborateurs, montre que l'ajout de ces ASU au milieu de culture des chondrocytes induit une inhibition de l'expression de la COX-2 et de l'iNOS ainsi qu'une répression dans la production de PGE<sub>2</sub> et NO (Au *et al.*, 2007). Les voies de signalisations pro-inflammatoires sont aussi altérées par un traitement aux ASU. Ainsi, la dégradation de l'inhibiteur IκB est diminuée et la translocation de p65 bloquée (Gabay *et al.*, 2008). Les insaponifiables exercent un effet sur l'activité MMP puisque des fibroblastes traités aux ASU induit une inhibition de l'activité des MMP-2, -3 et -13 (Kut-Lasserre *et al.*, 2001 ; Gabay *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.6 Les acides gras de type oméga-3

Parmi les acides gras polyinsaturés présents dans notre alimentation, on retrouve les oméga-3 et -6. Ils se distinguent entre eux de par la position de la double liaison dans la chaîne carbonée. Les oméga-3 (acides linoléique et eicosapenténoïque) abondent dans les huiles à base de poissons et dans les fruits secs tandis que les oméga-6 (acides linoléique et arachidonique) sont principalement présents dans la viande et certaines huiles végétales (Ameye and Chee, 2006).

L'intérêt porté autour des oméga-3 provient de leur bénéfice sur la santé et plus particulièrement de leur effet potentiel sur les pathologies inflammatoires telles que l'arthrite, l'asthme ou encore la maladie d'Alzheimer (Arita *et al.*, 2005). *In vitro*, des cultures de chondrocytes bovins traités avec des oméga-3 montrent une diminution dans l'expression et l'activité des aggrecanases. L'expression de la COX-2 dans ces mêmes cultures s'en retrouve également diminuée (Curtis *et al.*, 2000). De même, une exposition aux oméga-3 d'explants cartilagineux ostéoarthriques induit une inhibition de l'expression et de l'activité des collagénases (MMP-3 et -13) (Curtis *et al.*, 2002).

### 1.5 Objectif de l'étude

Les pathologies articulaires dégénératives induisent l'expression et la sécrétion de MMP. Clegg et ses collaborateurs ont par ailleurs déjà montré que des chevaux atteints d'ostéoarthrite présentent une activité MMP-2 et MMP-9 synoviale bien supérieure à celle que l'on peut observer chez des chevaux sains (Clegg *et al.*, 1997).

Bien que de nombreuses études *in vitro* démontrent les effets des compléments alimentaires à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur les chondrocytes, les effets d'une complémentation *in vivo* sont plus suggestifs (basés sur une atténuation des symptômes) et peu d'études confirment ce qui est observé *in vitro*.

L'objectif de la présente étude est d'investiguer l'effet d'une complémentation *in vivo* de six semaines à base de glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* sur le liquide synovial et les chondrocytes de chevaux cliniquement sains. Dans l'hypothèse où le complément aurait un effet, une modulation dans l'activité MMP-2 devrait être observée comparée aux chevaux complémentés avec un placebo. L'expression des MMP étant sous le contrôle de NF- $\kappa$ B, une complémentation pourrait moduler l'activation ainsi que la translocation du facteur de transcription.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1 Schéma expérimental

L'objectif de l'étude était de tester l'effet chondroprotecteur d'un complément alimentaire à base de glucosamine, de chondroïtine sulfate et d'*Harpagophytum procumbens* sur l'équilibre enzymatique articulaire d'un cheval sain. Pour ce faire, des poneys ont été scindés en deux groupes homogènes et complémentés pendant six semaines avec le nutraceutique ou le placebo. Avant et après complémentation, des examens orthopédiques ont été effectués et des scores de boiteries attribués (T0 et T6).

Après euthanasie, des prélèvements *post-mortem* ont été réalisés. La synovie a été ponctionnée sur de l'articulation des boulets afin de quantifier l'activité de la MMP-2. Les membres antérieur et postérieur gauches de chaque animal ont été récupérés et les chondrocytes de chaque boulet mis en culture. Après une stimulation à l'interleukine 1- $\beta$ , le surnageant a été récupéré en vue de quantifier l'activité MMP-2 et une extraction de protéines nucléaires a été effectuée sur les chondrocytes afin de pouvoir déterminer la quantité de NF- $\kappa$ B actif présent dans les extraits.

### 2.2 Animaux et nutraceutique

Quatorze poneys sains ont été nécessaires pour les besoins de l'expérimentation. Ils étaient tous âgés entre 1 et 3 ans et pesaient entre 80 et 130 kg. Hébergés au centre de recherches ovines des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, les animaux disposent de deux semaines d'acclimatation avant le début de la complémentation. Suite à cette période, un examen orthopédique est effectué et des scores de boiteries sont attribués pour chaque membre (données T0).

Sur base de ces scores, deux groupes homogènes A et B sont formés où l'un a reçu le complément alimentaire à base de glucosamine hydrochloride (6000 mg/jour), chondroïtine sulfate (4000 mg/jour), d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* (3000 mg/jour), cuivre (80 mg/jour), zinc (180 mg/jour), manganèse (320 mg/jour) tandis que l'autre groupe a reçu un placebo. Ainsi, ils sont nourris deux fois par jour : une fois avec du complément ou du placebo mélangé aux concentrés et une seconde fois avec du foin uniquement. Le complément alimentaire et le placebo se présentent sous la forme d'une poudre à mélanger à l'aliment concentré (mélange avoine-orge-mais mélassé). On s'assure que les poneys ont ingéré leur complément en les attachant à l'aide d'un licol devant leur mangeoire jusqu'à ce qu'ils aient ingéré leur ration. Une fois par jour et pendant une heure au moins, les poneys vont en prairie. Pour des raisons pratiques, la complémentation entre les chevaux a été différée dans le temps de manière à ce que trois poneys finissent leur période de complémentation par semaine. L'expérimentation a été réalisée en « aveugle » dans le sens où les expérimentateurs n'ont pas connaissance de l'identité du groupe complémenté. Ils n'en ont été informés que lorsque les analyses furent terminées. Au terme de la complémentation, des examens orthopédiques ont été de nouveau effectués (données T6) avant que les poneys ne soient emmenés au laboratoire d'Anatomie Animale.

Le protocole expérimental a été validé par le comité du bien être animal des FUNDP.

### 2.3 Examen orthopédique

Les poneys sont examinés avant (T0) et après la période de complémentation (T6). De manière à standardiser les résultats, les examens ont tous été réalisés par un vétérinaire spécialisé en orthopédie équine. Ils consistent en une inspection et palpation des extrémités digitées, en une évaluation des allures au pas et au trot et ensuite en une flexion forcée de chaque membre (Fig.11) durant 30 à 40 secondes. Passé ce délai, le cheval part au trot ce qui permet d'identifier l'apparition ou l'accentuation d'une éventuelle boiterie. Selon la gravité de la boiterie, le vétérinaire attribue à chaque membre un score compris entre 0 (pas de boiterie observable) et 5 (boiterie sévère). Un score total est déterminé sur l'ensemble des quatre membres de l'animal compris entre 0 et 20.

### 2.4 Culture de chondrocytes

#### 2.4.1 Préparation des solutions enzymatiques et des milieux de culture

Hyaluronidase 0,1 % et Pronase 0,1 % : 0,2 g de hyaluronidase ou de pronase en poudre est pesé puis dissout dans 50 ml de PBS complémenté avec 2 % de Penicilline-Streptomycine (PS). La solution est filtrée (filtres 0,22 µm) puis diluée 2 x avec du PBS 2 % PS.

Collagénase 0,1 % : 0,2 g de collagénase en poudre est pesé puis dissout dans 50 ml de milieu optiMEM 2 % PS, 50 µM de β-propiolactone. La solution est ensuite filtrée (filtres 0,22 µm) puis diluée 2 fois dans du milieu optiMEM 2% PS, 50 µM de β-propiolactone.

Milieu optiMEM 10 % FBS, 2 % PS, 1 % AANE, 5 % SP : 50 ml de FBS, 10 ml de PS, 5 ml d'AANE et 5 ml de SP sont ajoutés à 500 ml de milieu optiMEM.

Milieu optiMEM 2 % PS, 50 µM de β-propiolactone : 10 ml de PS et 1 ml de β-propiolactone sont ajoutés à 500 ml de milieu optiMEM.

#### 2.4.2 Récupération du cartilage

Au terme de la complémentation, les poneys sont amenés au laboratoire d'Anatomie Animale où ils sont euthanasiés par saignée. Les membres antérieurs et postérieurs gauches sont alors prélevés et ramenés au laboratoire de Physiologie Animale. La peau du membre y est retirée au moyen d'un scalpel puis le membre est lavé soigneusement à l'eau distillée afin d'éliminer les contaminants éventuels (poils). Sous une hotte stérile à flux laminaire, les tendons, les ligaments et la capsule articulaire du boulet sont incisés au scalpel. La synovie est récupérée au moyen d'une seringue stérile puis déposée dans des tubes 15 ml. Le cartilage est ensuite collecté sous forme de fins copeaux dans une boîte de pétri contenant du PBS 4 % PS. Les copeaux sont enfin découpés de manière plus fine puis rincés deux fois au PBS 2 % PS.

### 2.4.3 Digestion enzymatique

Une fois le PBS 2 % PS décanté, les solutions enzymatiques suivantes sont ajoutées de manière successive : 10 ml de Hyaluronidase 0,1 % pendant 10 minutes à 37°C, 10 ml de Pronase 0,1 % pendant 30 minutes à 30°C, 10 ml de Trypsine 0,25 % (solution prête à l'emploi) pendant 30 minutes à 37°C et enfin 10 ml de collagénase 0,1 % pendant une nuit à 37°C.

### 2.4.4 Mise en culture des chondrocytes

Sous hotte, le contenu de la boîte de pétri est homogénéisé, filtré (filtres 0,70 µm) puis déposé dans un falcon 50 ml. Après une centrifugation de 20 minutes à 296 g, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 ml de milieu optiMEM 10 % FBS, 2 % PS, 1 % AANE et 5 % SP. Une fraction de cette suspension est ensuite diluée 5 fois avec du milieu optiMEM puis 2 fois dans du Bleu de Trypan en vue de réaliser un comptage cellulaire sur lame de Neubauer. Le Bleu de trypan pénètre les cellules mais il est immédiatement rejeté dans le milieu extracellulaire si bien que, sous un microscope, les cellules vivantes apparaissent blanches et les cellules mortes apparaissent bleues. Le comptage s'effectue sur 8 grands carrés (chaque carré contient 16 petits carrés) et la quantité de cellules en suspension est estimée via la formule suivante :

$$\frac{\text{nombre de cellules comptées sur 8 grands carrés} \times \text{volume déposé sur la plaque (10 } \mu\text{l}) \times \text{facteur de dilution (10x)} \times 1000}{8}$$

Les chondrocytes sont cultivés sur des plaques 6 puits. Comme chaque puits estensemencé avec 950000 cellules par puits, le volume de suspension cellulaire à prélever est déterminé en fonction du comptage cellulaire. 2 ml de milieu optiMEM 10 % FBS, 2 % PS, 1 % AANE et 5 % SP sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques de culture sont ensuite incubées à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> et le milieu est renouvelé tout les 3 jours.

### 2.4.5 Stimulation à l'interleukine 1-β

Après 6 jours, le milieu de culture est éliminé et remplacé par du milieu sans sérum (milieu pauvre). Deux jours plus tard, les chondrocytes sont stimulés avec différentes doses d'IL-1β (2,5 ng/ml, 5 ng/ml et 10 ng/ml) et chaque condition a été réalisée en triplicat.

De manière à étudier l'effet du complément alimentaire sur l'activité MMP-2, les chondrocytes sont stimulés pendant 24 heures. Le surnageant est collecté, aliquoté dans des eppendorfs puis conservé à -80°C et à -20°C. Les cellules sont rincées au PBS puis 500 µl de NaOH 0,1 M sont ajoutés dans le puits en vue d'un dosage de protéines : le NaOH entraîne la lyse des cellules libérant les protéines. Le fond de chaque puits est gratté puis le surnageant est aliquoté dans des eppendorfs à -20°C.

De manière à investiguer l'effet du complément alimentaire sur l'activation de NF-κB, les chondrocytes sont stimulés pendant 45 minutes par l'ajout de 2,5, 5 et 10 ng/ml d'interleukine 1-β dans le milieu de culture. Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Remarque : certaines cultures de chondrocytes ont été réalisées à partir de chevaux sains de manière à éviter de puiser dans nos échantillons expérimentaux lors de la mise au point de certains protocoles.



## 2.5 Extraction nucléaire

### 2.5.1 Préparation des solutions

Solution de lavage : 100 µl de tampon HEPES 0,5 M, 50 µl KCl 2 M, 5 µl MgCl<sub>2</sub> 2 M, 2 µl EDTA 0,25 M, 4,8 ml H<sub>2</sub>O

Tampon d'extraction cytoplasmique : 100 µl de tampon HEPES 0,5 M, 25 µl KCl 2 M, 5 µl MgCl<sub>2</sub> 2 M, 2 µl EDTA 0,25 M, 1,8 ml H<sub>2</sub>O et 10 µl Nonidet P40 0,2 %

Tampon d'extraction nucléaire : 200 µl de tampon HEPES 0,5 M, 3,5 µl MgCl<sub>2</sub> 2 M, 4 µl EDTA 0,25 M, 1,6 ml H<sub>2</sub>O, 1,25 ml de glycérol, PIB 25 fois et PIC 10 fois

PBS-Mo : 24 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et 21 mg de NaF dissous dans 100 ml de H<sub>2</sub>O

Tampon de lyse : 10 ml de HB 2 fois, 400 µl de Nonidet P40 10 % et 9,6 µl de H<sub>2</sub>O

RE bis : 10 ml de HB 2 x, 4 ml de glycérol 87 %, 6 ml de H<sub>2</sub>O, PIB 25 x et PIC 10 x

SA bis : 10 ml de HB 2 x, 4 ml de glycérol 87 %, 4 ml de NaCl 4 M, 2 ml de H<sub>2</sub>O, PIB 25 x et PIC 10x

### 2.5.2 Méthode d'extraction

#### 2.5.2.1 Protocole 1

Après la stimulation, les cellules sont lavées avec du PBS, du PBS-Mo et une solution de HB 1 fois respectivement. 500 µl de tampon de lyse sont alors ajoutés dans chaque puits. Les cellules lysées sont décrochées du fond du puits, aliquotées dans un eppendorf puis soumises à une centrifugation de 15142 g pendant 30 secondes. Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans 180 µl de RE bis et 240 µl de SA bis, mis sous agitation pendant 30 minutes et centrifugé 10 minutes à 15142 g. Enfin, les surnageants contenant les protéines nucléaires sont récupérés, aliquotés dans des eppendorfs puis conservés à -80°C.

#### 2.5.2.2 Protocole 2

Après la stimulation, les cellules sont lavées avec du PBS et une solution de lavage (WASH) respectivement. 300 µl de tampon d'extraction cytoplasmique sont alors ajoutés dans chaque puits. Les cellules lysées sont décrochées du fond du puits, aliquotées dans un eppendorf puis soumises à une centrifugation de 3225 g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans 110 µl de tampon d'extraction nucléaire, mis sous agitation pendant 15 minutes et centrifugé 25 minutes à 18000 g. Enfin, les surnageants contenant les protéines nucléaires sont récupérés, aliquotés dans des eppendorfs puis conservés à -80°C.

## 2.6 La zymographie

### 2.6.1 Principe

La zymographie est une application directe de la technique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Ainsi, si la zymographie permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, elle permet également de révéler ou de quantifier une activité protéasique : le substrat d'une protéase d'intérêt est ajouté préalablement au gel si bien qu'après coloration, on assiste à l'apparition de bandes blanches sur fond bleu, correspondant aux zones où le substrat a été dégradé (Lombard *et al.*, 2005).

### 2.6.2 Préparation des solutions et réactifs

Acrylamide 30 % : 58,4 g d'acrylamide et 1,6 g de bis-acrylamide dissous dans 125 ml d'eau distillée puis amené à 200 ml. La solution est ensuite conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

Tampon Tris 1,5 M pH 8,8 : 45,43 g de Tris dissous dans 200 ml d'eau distillée. Le pH est ensuite ajusté à 8,8 avec une solution de HCl 10 N puis amené à 250 ml. La solution est conservée à 4°C.

SDS 10 % : 5 g de SDS dissous sous agitation dans 45 ml d'eau distillée puis amené à 50 ml

APS 10 % : 0,4 g d'APS dissous dans 4 ml d'eau distillée puis vortexée. La solution se conserve une semaine à 4°C.

Gélatine 1 % : 1 g de gélatine dissous dans 100 ml d'eau distillée en chauffant mais en veillant bien à ce que la solution ne bout pas. Une fois aliquotée dans des tubes de 15 ml, la solution se conserve pendant un mois maximum.

Triton X-100 2 % : 20 ml de Triton X-100 dissous dans 1 litre d'eau distillée (à réaliser de préférence la veille car le Triton se met difficilement en solution). La solution se conserve à température ambiante.

Tampon d'incubation pH 7,5 : 30,3 g de Tris, 7,35 g de  $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$  et 1 g de  $\text{NaN}_3$  dissous dans 4,5 l d'eau distillée. Le pH est ajusté avec une solution de HCl 10 N. Le volume est alors amené à 5 l. La solution se conserve à 4°C.

Laemmli : 5 g de SDS et 2 g de sucrose dissous dans 45 ml de tampon Tris 0,25 M pH 6,8. Une pointe de Bleu de Bromophénol est ajoutée puis le volume est amené à 50 ml avec du Tris 0,25 M pH 6,8.

Tampon de migration : 30 g de Tris, 144 g de glycine et 10 g de SDS dissous dans 1 l d'eau distillée. La solution est diluée 10 fois avant son utilisation.

Colorant : 0,5 g de bleu de Coomassie G250 dissous dans un mélange de 200 ml de méthanol et de 50 ml d'acide acétique. Le volume est ensuite amené à 500 ml avec de l'eau distillée.

Décolorant : 200 ml de méthanol et 100 ml d'acide acétique amené à 1 l d'eau distillée

### 2.6.3 Préparation des échantillons et des standards pour l'électrophorèse

#### 2.6.3.1 Détermination de l'activité MMP-2 dans la synovie

##### A. Standardisation par rapport au volume de synovie

Une fois décongelés, les échantillons de fluide synovial sont dilués avec du Laemmli (solution préparée à partir de Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, 10 % SDS, 4 % sucrose et d'une pointe de Bleu de Bromophénol). Une dilution 50 fois est réalisée pour quantifier l'activité MMP-2. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 1 heure à 37°C.

##### B. Standardisation par rapport à la concentration en protéines synoviale

La concentration en protéines dans la synovie a été déterminée via l'utilisation d'un kit BCA (Pierce Biotechnology, USA). Les échantillons de fluide synovial sont dilués avec du Laemmli de manière à déposer 4 µg de protéines dans chaque puits. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 1 heure à 37°C.

#### 2.6.3.2 Détermination de l'activité MMP-2 dans les surnageants

##### A. Standardisation par rapport à la concentration protéique des cellules

La concentration en protéines des chondrocytes lysés a été déterminée via l'utilisation d'un kit BCA (Pierce Biotechnology, USA). Les surnageants sont dilués dans du Laemmli de manière à déposer 2 µg de protéines par puits et incubés pendant 1 heure à 37°C.

##### B. Standardisation par rapport à la concentration protéique des surnageants

La concentration en protéines dans les surnageants a été déterminée via l'utilisation d'un kit BCA (Pierce Biotechnology, USA). Ils sont ensuite dilués dans du Laemmli de manière à déposer 4 µg de protéines par puits et incubés pendant 1 heure à 37°C.

### 2.6.4 Préparation de l'électrophorèse

Le dispositif utilisé ici est l'OmniPAGE Vertical Gel Casting System. Une fois rincées à l'eau distillée et séchées, les plaques de l'électrophorèse sont montées de la manière suivante : trois plaques de verres sont insérées dans le dispositif de manière à ce que la petite plaque de verre soit orientée côté manipulateur et la grande plaque soit orientée côté externe. Une petite plaque de verre avec un « spacer » est alors insérée entre ces deux plaques si bien qu'il est possible de réaliser 4 gels au lieu de 2. Le montage est réalisé sur un support dur de manière à assurer un alignement parfait entre les plaques et une fois maintenues grâce aux vis de compression, l'ensemble du dispositif est transféré sur un socle où il sera fixé à l'aide de pinces.

### **2.6.5 Préparation du gel de séparation (running gel)**

Un gel de séparation contenant 10 % en acrylamide et 0,1 % de gélatine est préparé suivant le protocole repris dans le tableau 2. Lorsque le TEMED est ajouté, la réaction de polymérisation se produit dans le mélange et le gel est alors rapidement coulé entre les plaques (environ 5,5 ml). L'oxygène ayant un effet inhibiteur sur la polymérisation, tout contact entre le gel et l'air environnant est entravé par l'addition de 300 µl d'isobutanol. Après 30 minutes de repos, l'alcool est absorbé au moyen de papier filtre Wathman puis rincé à l'eau distillée.

### **2.6.6 Préparation du gel de compression (stacking gel)**

Un gel de concentration contenant 4 % en acrylamide est ensuite préparé suivant le protocole repris dans le tableau 2. Une fois le TEMED ajouté, le gel est superposé au gel de séparation jusqu'à l'extrémité supérieure des plaques. Des peignes en plastiques sont enfin insérés dans le gel de manière à former des puits tout en veillant bien à ce qu'aucune bulle ne soit présente aux alentours. Après 45 minutes, le gel est polymérisé et les peignes sont alors retirés.

### **2.6.7 Migration des échantillons**

Le dispositif est alors introduit dans une cuve en plastique. Un tampon de migration est dilué 10 fois dans de l'eau distillée puis ajouté dans la cuve jusqu'à immersion totale des plaques. 20 µl des échantillons et des standards sont par la suite déposés dans les puits appropriés tandis que les puits vides sont remplis avec 20 µl de Laemmli de manière à équilibrer la cuve. Le couvercle est installé sur la cuve et un courant d'une intensité de 190 mA est appliqué (pour 8 gels) durant 1h45 environ. Une fois que le front de migration atteint l'extrémité inférieure du gel, le courant est stoppé et les cuves sont vidées de leur tampon.

### **2.6.8 Incubation des gels**

Les plaques sont retirées du dispositif. Les gels sont démoulés sous un filet d'eau puis déposés dans des boîtes en plastique préalablement remplies de Triton X-100 2 %. Après 30 minutes sous agitation, la solution est renouvelée. 30 minutes plus tard, les gels sont rincés à l'eau distillée puis placés pendant 10 minutes à température ambiante et sous agitation dans du tampon d'activation Tris-HCl pH 7,5. Ils sont alors incubés à 37°C dans ce même tampon pendant une durée variable de 24 à 48 heures.

### **2.6.9 Coloration et décoloration des gels**

Les gels sont rincés sous de l'eau distillée puis colorés pendant 30 minutes sous agitation et à température ambiante au moyen d'une solution contenant du Bleu de Coomassie. Après coloration, les gels sont rincés brièvement sous de l'eau distillée puis décolorés dans une solution de décoloration pendant 2h30.

### 2.6.10 Quantification de l'activité MMP

Une image informatique des gels est obtenue via l'utilisation d'un scanner (hp scanjet 5530 photosmart scanner) relié à un ordinateur personnel. Les gels placés dans de l'eau distillée sont alors stockés à 4°C dans la chambre froide pour pallier à tout problème éventuel. Ces images sont enfin analysées via un programme informatique approprié (Scion Image for Windows) pour une quantification des bandes gélatinolytiques. Afin d'éliminer tout effet du gel dans l'activité MMP, les valeurs sont divisées par la valeur de la dilution S5 du standard pro-MMP-2.

## 2.7 La technique Trans-AM (Transcription factor ELISA assay)

### 2.7.1 Principe

Une Trans-AM reprend les bases d'un ELISA classique : des ADN « trappeurs » contenant le site consensus de liaison de NF-κB sont immobilisés au fond du puits. Si le facteur de transcription est présent dans un extrait, il va se fixer aux ADN trappeur. Ainsi, l'ajout d'un anticorps primaire dirigé contre une des sous-unités de NF-κB (p65 ou p50) puis d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP) et dirigé contre le premier, induit une réaction colorimétrique en présence de TMB (substrat de la peroxydase) quantifiable par spectrophotométrie.

### 2.7.2 Préparation des solutions

Tampon de lyse : 1ml de solution stock auquel on ajoute un 40 µl de PIC et 5 µl de DTT 1 M.

Tampon BBC : 400 µl de solution de tampon BB stock auquel on ajoute 200 µl d'H<sub>2</sub>O, 200 µl de BSA 5 %, 200 µl d'ADN de sperme de saumon et 2 µl de DTT 1 M.

PBS bis : Dissoudre 1,5 g de NaCl 10 ml de tampon phosphate. La solution est amenée à 500 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution d'HCl 10 N.

### 2.7.3 Dosage protéique des extraits nucléaires par la méthode Bradford

Une solution stock de Bradford est diluée 5 fois puis filtrée avant utilisation. Dans chaque tube, 2 µl d'extrait nucléaire est ajouté à 1 ml de solution de Bradford. Après 5 minutes de réaction, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 595 nm et toutes les lectures sont réalisées en duplicat. Pour obtenir la concentration protéique des extraits, une droite de calibration est réalisée à partir des valeurs d'absorbance de différentes dilutions d'une solution stock de BSA (2 mg/ml) (Tableau 3).

### 2.7.4 Fixation des extraits nucléaires

Selon la concentration en protéines, les extraits nucléaires sont dilués dans du tampon de lyse de manière à déposer 5 µg de protéines par puits pour un volume final de 20 µl. A ces 20 µl d'extraits, 30 µl de tampon BBC sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation sous agitation d'une heure à température ambiante, les puits sont alors lavés 3 fois avec du PBS bis Tween 0,1 %.

### **2.7.5 Fixation de l'anticorps primaire**

L'anticorps primaire anti-p65 est dilué 1000 fois dans une solution de PBS bis Gloria 1 % puis 100 µl de la solution sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation d'une heure à température ambiante, les puits sont rincés 4 fois avec 200 µl de PBS bis Tween 0,1 %.

### **2.7.6 Fixation de l'anticorps secondaire**

L'anticorps secondaire est dilué 1000 fois dans une solution de PBS Gloria 1 % puis 100 µl de la solution sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation d'une heure à température ambiante, les puits sont rincés 4 fois avec 200 µl de PBS bis Tween 0,1 %. 100 µl de TMB sont alors déposés puis la plaque est placée dans l'obscurité. 10 minutes plus tard, 100 µl de solution STOP sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est prête pour une lecture spectrophotométrique à 405 nm.

## **2.8 Immunofluorescence de p65 dans les chondrocytes équins**

### **2.8.1 Principe**

L'immunofluorescence permet de localiser et de visualiser une ou plusieurs protéines d'intérêt dans une cellule préalablement fixée et perméabilisée via l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes.

### **2.8.2 Préparation des solutions**

PBS-BSA 2 % : dissoudre 2 g de BSA dans 100 ml de PBS pH 7,4 (20 ml de tampon PO<sub>4</sub>, 9 g de NaCl portés à un litre)

PBS-Triton X-100 1 % : Dissoudre, à l'aide d'un agitateur magnétique, 1 g de Triton X-100 dans 100 ml de PBS.

Paraformaldéhyde 4 % : 4 g de paraformaldéhyde est chauffé à 80°C dans 100 ml de PBS

### **2.8.3 Culture de chondrocytes**

La veille de la mise en culture, les lames couvre-objets (cover-slip) sont préalablement rincées à l'alcool, déposées dans les puits d'une plaque 6 puits et enfin, incubées dans du sérum décomplémenté (FBS chauffé pendant 30 minutes à 60°C) pendant 24 heures. Les chondrocytes sont isolés et cultivés suivant la même procédure que le point 2.4 ci-dessus jusqu'à ce que les cellules soient presque confluentes (environ 60-70 % de confluence). Les cellules sont ensuite stimulées avec 5 ng/ml d'IL-1β pendant 15, 30 et 45 minutes. Chaque condition a été effectuée en double.

### **2.8.4 Fixation et perméabilisation des cellules**

Le milieu de culture est aspiré puis remplacé par l'ajout de 800 µl de paraformaldéhyde 4 % dans chaque puits afin de fixer les cellules. Après 10 minutes, un rinçage au PBS est réalisé avant d'ajouter 1 ml de PBS-Triton X-100 1 % dans chaque puits. Cinq minutes plus tard, un triple rinçage au PBS-BSA 2 % est effectué.

### **2.8.5 Immunomarquage**

En chambre humide, 30 µl d'anticorps primaire anti-p65 (dilué 300 fois) sont déposés sur du parafilm. Les lames couvre-objets sont retournées, déposées sur ces gouttes d'anticorps puis incubées pendant 2 heures en chambre froide. Passé ce délai, les lames sont rincées 3 fois dans la plaque de culture (cellules en surface) avec du PBS-BSA 2 %. La même procédure est appliquée pour l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa. Néanmoins, l'anticorps secondaire est dilué 1000 fois et une incubation d'1 heure en chambre froide suffit.

### **2.8.6 Marquage des noyaux**

En chambre froide, 30 µl de TO-PRO-3, dilué 80 fois dans de la RNase 2 mg/ml de PBS sont déposés sur du parafilm. Les lames couvre-objets sont retournées, déposées sur ces gouttes de TO-PRO-3 puis incubées pendant 30 minutes en chambre froide. Enfin, un rinçage au PBS est effectué.

### **2.8.7 Montage des lames et révélation**

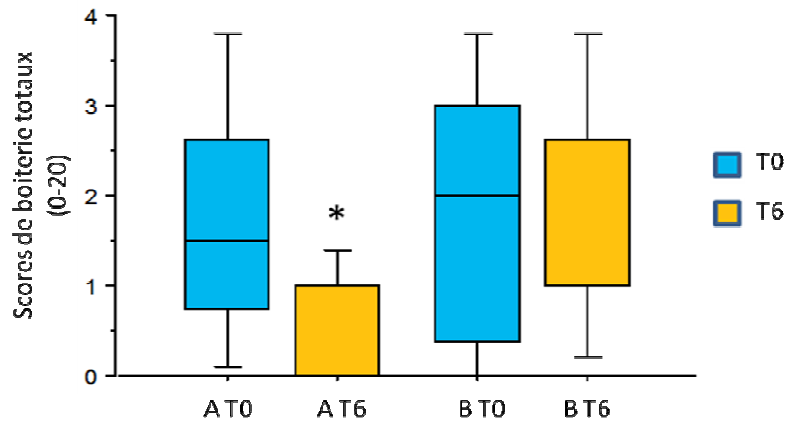
Les couvre-objets sont montées sur des lames porte-objets dégraissées à l'alcool à l'aide de Mowiol chauffé à 56°C puis examinées sous un microscope confocal.

## **2.9 Analyse statistique des données**

Les analyses statistiques ont été réalisées via un logiciel informatique Statview®. Les données de l'activité MMP-2 dans les surnageants et le liquide synovial ont été divisées par le standard de manière à éliminer un quelconque effet du gel puis analysées par une analyse de variance (ANOVA). Les données concernant les concentrations en protéines totales ont été également analysées par ANOVA. Les scores de boîtes étant des valeurs non-paramétriques, les données ont été analysées via un test de Mann-Whitney et/ou un test de Wilcoxon. Les valeurs de P inférieures au seuil  $\alpha$  établi (0,05) sont considérées comme significativement différentes.

### 3. Résultats

#### 3.1 Tests de flexions



**Figure 12. Scores de boiteries totaux avant (T0) et après complémentation (T6).** Les tests de flexions ont été réalisés sur les quatre membres de chaque animal avant et après complémentation. Des scores ont été attribués, la somme effectuée sur l'ensemble des quatre membres de chaque poney (score maximal=20) et comparés au sein de chaque groupe (A ou B) entre T0 et T6. La ligne dans chaque rectangle représente la médiane. Les bords supérieurs et inférieurs de chaque cadre correspondent respectivement aux percentiles 25 et 75 tandis que les barres inférieures et supérieures qui s'étendent au-delà du cadre correspondent aux percentiles 10 et 90. \*significativement différent de T6 ( $P < 0,05$ ,  $nA=7$ ,  $nB=7$ ) ; (test de Wilcoxon).

Des scores de boiteries compris entre 0 (pas de boiterie observée) et 5 (boiterie sévère) ont été déterminés sur les quatre membres de chaque cheval avant (T0) et après complémentation (T6). Les scores de boiterie totaux ont ensuite été déterminés en additionnant les scores de chaque membre au sein d'un même poney puis comparés entre groupes (A et B) et entre T0 et T6. Comme le montre le graphique (Fig.12), les scores de boiteries dans le groupe B ne diffèrent pas de manière significative entre T0 et T6 ( $P=0,657$ ). Dans le groupe A, c'est la situation inverse qui est observée où les scores sont significativement différents entre T0 et T6 ( $P=0,0471$ ). A T0 et T6, aucune différence significative n'est observée entre le groupe A et B ( $P=0,749$  et  $0,0816$  respectivement).

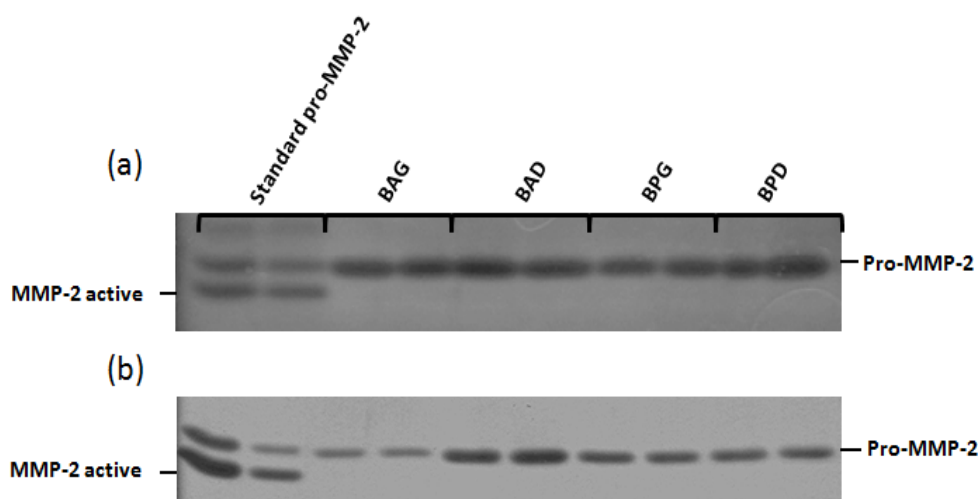


### 3.2 Quantification de l'activité MMP-2 dans le liquide synovial

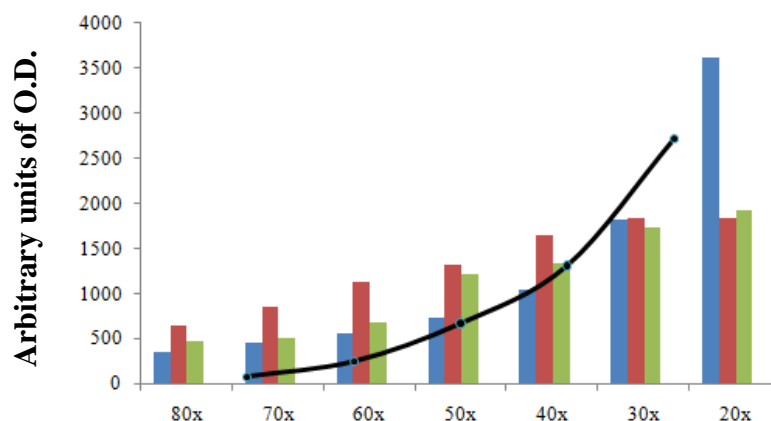
#### 3.2.1 Standardisation par rapport au volume de synovie

La zymographie du liquide synovial dilué 20 fois révèle une activité gélatinolytique dans tous les échantillons expérimentaux (Fig.13a). En comparant avec l'activité du standard pro-MMP-2 à celle des échantillons, nous pouvons en déduire que l'activité gélatinolytique dans la synovie correspond à la présence de la pro-MMP-2. Néanmoins, l'intensité des bandes est trop élevée au point que certaines se chevauchent. La quantification de l'activité en utilisant le protocole original est dès lors impossible. Aucune bande correspondant à la MMP-2 active n'a été observée.

Le liquide synovial du cheval n°5, n°10 et d'un cheval quelconque ont été dilués de 20 à 80 fois. Le graphique de la Fig.14 représente l'activité de la pro-MMP-2 dans chaque dilution. L'activité gélatinolytique diminue au plus on dilue la synovie et ce, quel que soit le cheval. De manière à pouvoir déterminer la dilution appropriée, l'activité lytique dans les différentes dilutions du standard pro-MMP-2 a été quantifiée et est représentée sur le graphique par le tracé noir. Idéalement, la dilution doit pouvoir se trouver dans la zone linéaire de l'activité du standard (entre S5 et S3). Etant donné que l'activité MMP-2 dans nos échantillons expérimentaux sature aux dilutions 20 et 30 fois, on suggère dès lors une dilution comprise entre 40 et 60 fois pour la quantification de l'activité pro-MMP-2.

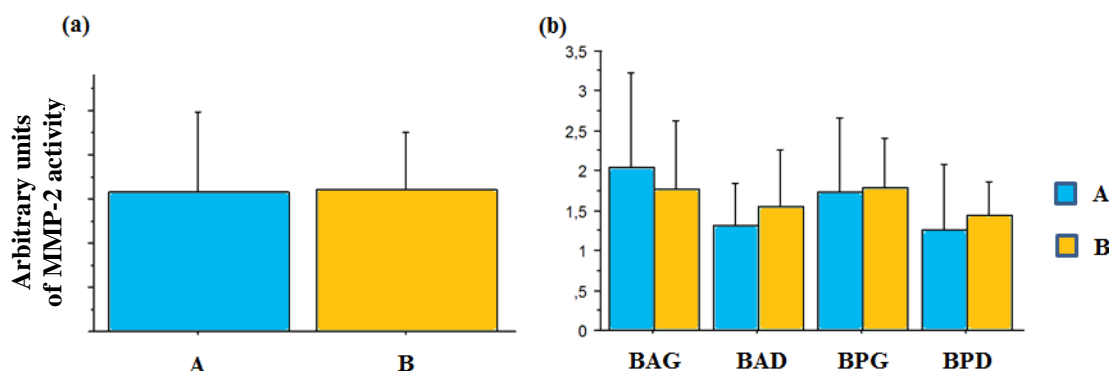


**Figure 13.** Zymogramme du standard de pro-MMP2 et d'échantillons de synovie dilués 20 fois (a) et 50 fois (b). BAG=Boulet Antérieur Gauche ; BAD= Boulet Antérieur Droit ; BPG=Boulet Postérieur Gauche ; BPD=Boulet Postérieur Droit. MMP-2= Matrix Metalloproteinase 2.



**Figure 14. Quantification de l'activité MMP-2 en fonction de la dilution.** Le graphique représente l'activité MMP-2 dans les échantillons de synovie du cheval n°5 (en bleu), du cheval n°10 (en rouge) et d'un cheval quelconque (en vert) dilués de 20 à 80 fois. Le tracé noir correspond quant à lui à l'activité MMP-2 en fonction des différentes dilutions du standard (de S2 à S6).

En appliquant une dilution 50 fois à nos échantillons (Fig.13b), les bandes sur les gels apparaissent plus petites mais elles sont également plus distinctes entre elles si bien que leur quantification via le software Scion s'en retrouve plus aisée.

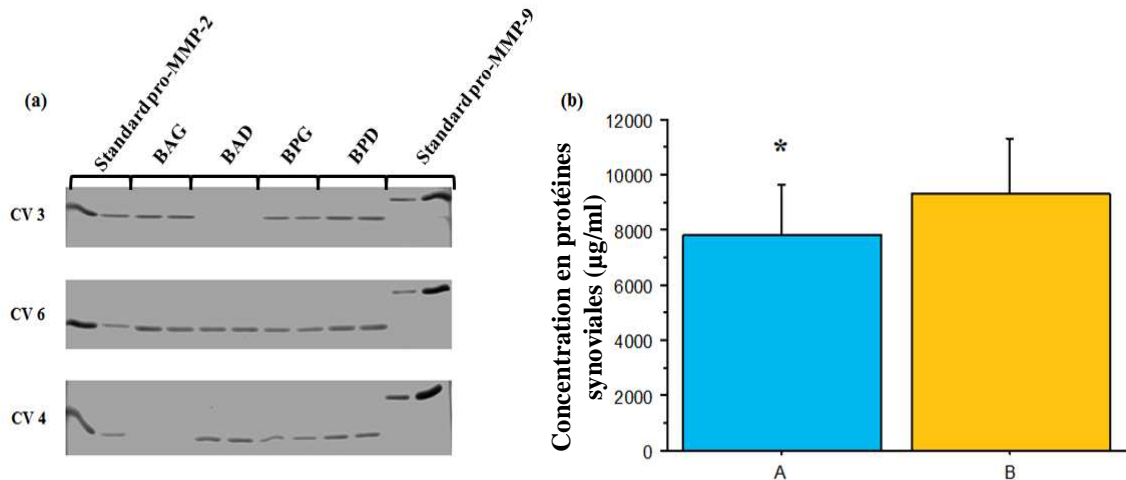


**Figure 15. (a) Quantification de l'activité pro-MMP-2 synoviale par zymographie standardisée par rapport au volume de synovie.** Le graphique présente l'activité de la pro-MMP-2 synoviale comparée entre les groupes A (n=26) et B (n=24) toute articulation confondue (ANOVA 1). **(b) Quantification de l'activité pro-MMP-2 synoviale dans les différents boulets par zymographie standardisée par rapport au volume de synovie.** L'activité pro-MMP-2 a été déterminée au sein de chaque boulet et comparée entre les groupes A (n=7) et B (n=7) (ANOVA 2). BAG : Boulet Antérieur Gauche (P=0,491) ; BAD : Boulet Antérieur Droit (P=0,676) ; BPG : Boulet Postérieur Gauche (P=0,631) ; BPD : Boulet Postérieur Droit (P=0,912). Les données sont montrées sous forme de moyennes et leurs écart-types.

La figure 15 montre l'activité MMP-2 standardisée par rapport au volume de synovie à la fois de manière globale (a) et au sein de chaque articulation (b). Après analyse statistique (ANOVA 2) on ne distingue aucun effet du traitement ou de l'articulation (P= 0,825 et 0,274 respectivement).

Aucune différence significative n'a pu également être mise en évidence entre les deux groupes que ce soit de manière globale (P=0,880) ou lorsque que l'on regarde au sein de chaque boulet (P=0,491, 0,676, 0,631 et 0,912 respectivement).

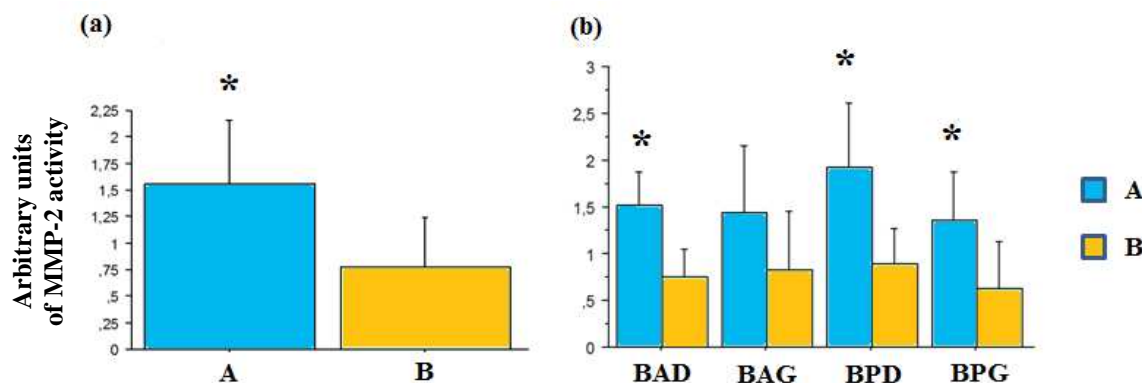
### 3.2.2 Standardisation par rapport au à la concentration en protéines synoviales



**Figure 16. (a) Zymogrammes d'échantillons de synovie des chevaux 3 (CV3), 6 (CV 6) et 4 (CV 4) standardisés par rapport à une quantité de 2 µg de protéines synoviales.** Les bandes observées sur les gels correspondent à la pro-MMP-2. Aucune bande correspondant à la MMP-2 active n'est observée aussi bien dans le standard que dans les échantillons expérimentaux. **(b) Concentration en protéines totales synoviales dans les groupes A (n=26) et B (n=24).** BAG : Boulet Antérieur Gauche ; BAD : Boulet Antérieur Droit ; BPG : Boulet Postérieur Gauche; BPD : Boulet Postérieur Droit. Les données sont montrées sous forme de moyennes et leurs écart-types. \*significativement différent du groupe B (ANOVA 1 ;  $P=0,0082$ )

Un dosage de protéines dans la synovie (Fig.16b) montre que la concentration en protéines est significativement supérieure dans la synovie des chevaux du groupe B comparé à celle des chevaux groupe A ( $P=0,008$ ).

La zymographie du liquide synovial standardisée par rapport à la concentration en protéines synoviales n'ayant jamais été réalisée auparavant, cette dernière a été testée pour une quantité de 2 µg en protéines dans la synovie des chevaux 3, 6 et 4 (Fig.16a). Des bandes correspondant à une activité pro-MMP-2 sont observées dans les trois échantillons de synovie. Elles sont également bien distinctes entre elles. Le protocole a donc été appliqué aux autres échantillons expérimentaux.



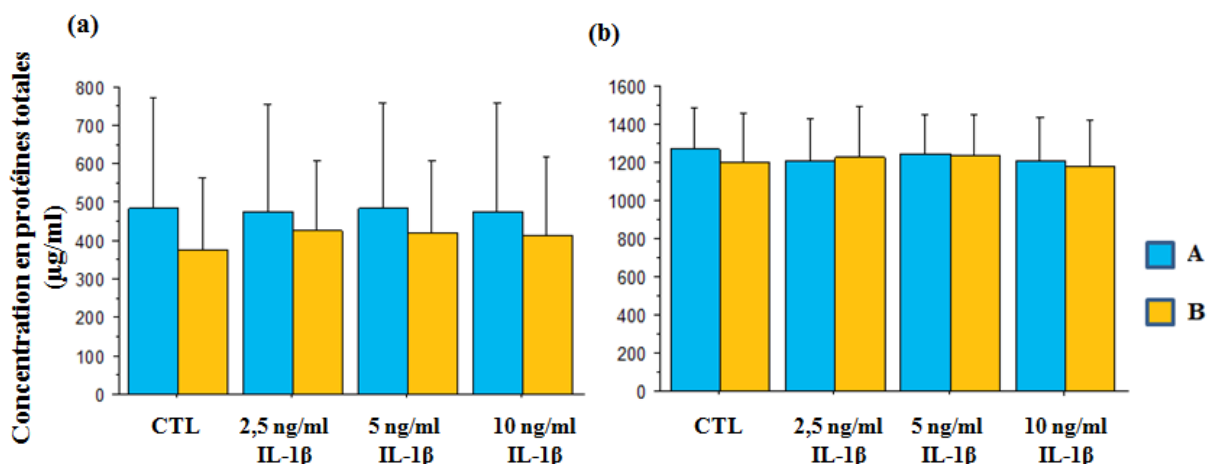
**Figure 17. (a) Quantification de l'activité pro-MMP-2 synoviale standardisée par rapport à la concentration en protéines synoviales. (b) Quantification de l'activité pro-MMP-2 synoviale au sein de chaque boulet standardisée par rapport à la concentration en protéines synoviales. BAG : Boulet Antérieur Gauche ; BAD : Boulet Antérieur Droit ; BPG : Boulet Postérieur Gauche; BPD : Boulet Postérieur Droit. Les données sont montrées sous forme de moyennes et leurs écart-types.\*significativement différent du groupe B (ANOVA ;  $P < 0,05$ )  $n_A = 7$  ;  $n_B = 7$ .**

La figure 17a représente l'activité pro-MMP-2 à la fois de manière globale tandis que la figure 17b représente cette même activité au sein de chaque articulation. Après analyse statistique, l'ANOVA2 réalisée permet de mettre en évidence un effet traitement significatif ( $P = 0,0001$ ). Aucun effet articulation significatif n'a cependant pu être démontré ( $P = 0,350$ ).

Il apparaît que l'activité gélatinolytique globale est significativement différente entre les deux groupes ( $P < 0,0001$ ). En effet, l'activité de la pro-MMP-2 dans le groupe A est supérieure à celle du groupe B (Fig.4c). Lorsque l'on regarde l'activité gélatinolytique au sein de chaque boulet (Fig.4d), il apparaît que l'activité pro-MMP-2 est significativement supérieure dans le groupe A dans le boulet antérieur droit (BAD) et les boulets postérieur gauche (BPG) et droit (BPD) ( $P = 0,012$ ,  $0,025$  et  $0,016$  respectivement). Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les deux groupes dans le boulet antérieur gauche (BAG) ( $P = 0,156$ ), l'activité pro-MMP-2 dans le groupe A tend à être supérieure par rapport au groupe B.

### 3.3 Quantification de l'activité MMP-2 dans les surnageants

#### 3.3.1 Concentration en protéines totales des chondrocytes et des surnageants

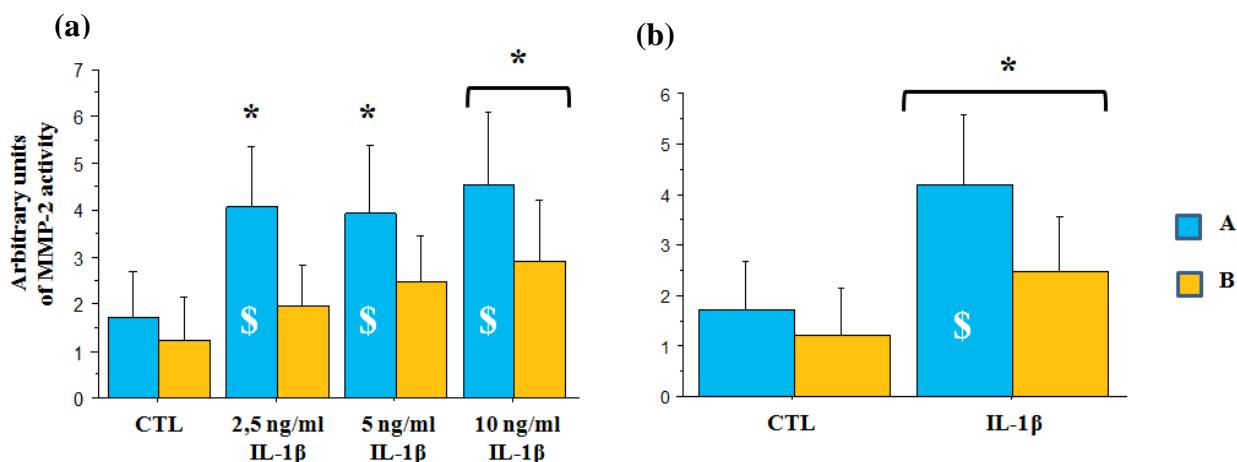


**Figure 20. Concentration en protéines totales dans les chondrocytes (a) et les surnageants (b).** (a) Les chondrocytes ont été stimulés avec 2,5, 5 et 10 ng/ml d'IL-1 $\beta$  pendant 24 h après quoi les cellules ont été lysées de manière à déterminer la concentration en protéines totales. On ne dénote aucun effet du traitement ni de la stimulation sur la concentration en protéines totales. (b) Les surnageants des cultures ont été récupérés après stimulation à l'IL-1 $\beta$ . Un dosage protéique a été effectué puis comparé entre les groupes et les différentes doses d'IL-1 $\beta$ . Aucun effet du traitement ni d'effet de la stimulation n'a pu être mis en évidence de manière statistique. (ANOVA 2 ; nA=9 ; nB=12) CTL=contrôle ; IL-1 $\beta$ =interleukine-1 $\beta$ . Les données sont montrées sous forme de moyennes avec leur écart-type.

Les cultures de chondrocytes ont été stimulées avec de l'IL-1 $\beta$  pendant 24h. Passé ce délai, les chondrocytes ont été lysés et un dosage a été effectué. Les surnageants ont été collectés et un dosage a été également réalisé.

Après analyse statistique, une ANOVA 2 ne permet pas de mettre en évidence un quelconque effet du traitement ou de la stimulation à l'IL-1 $\beta$  sur la concentration en protéines totales que ce soit dans les chondrocytes ( $P=0,627$  et  $0,932$  respectivement) ou les surnageants ( $P=0,176$  et  $0,989$ ).

### 3.3.2 Standardisation par rapport à la concentration protéique des chondrocytes



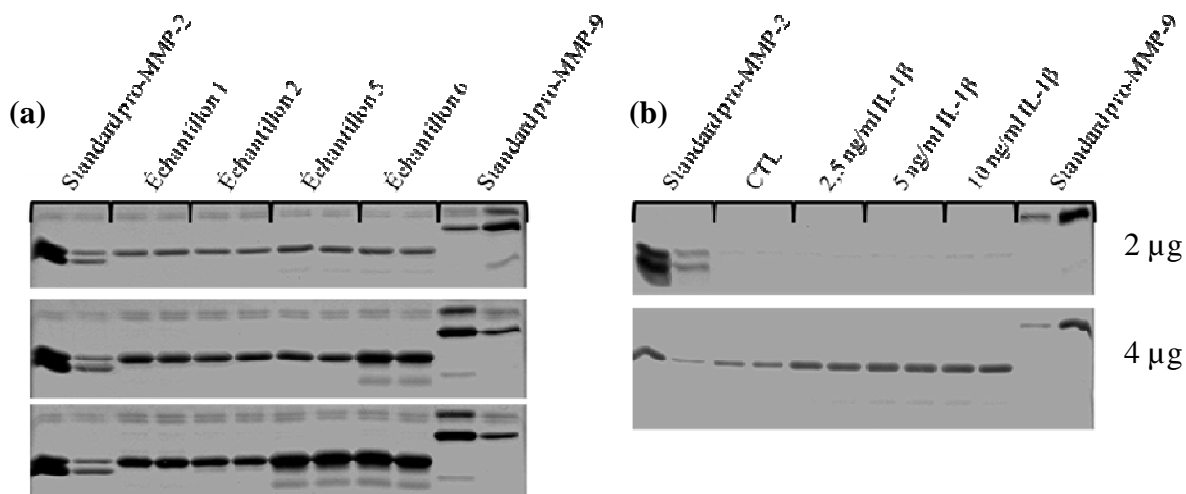
**Figure 18. (a) Activité pro-MMP-2 dans les surnageants non stimulés (CTL) et stimulés avec 2,5, 5 et 10 ng/ml d'IL-1 $\beta$ .** L'activité MMP-2 a été déterminée par zymographie standardisée par rapport à une quantité de 2  $\mu$ g de protéines des chondrocytes puis comparée entre groupes et les différentes doses d'IL-1 $\beta$ . **(b) Activité pro-MMP-2 dans les surnageants non stimulés (CTL) et stimulés (IL-1 $\beta$ ).** Etant donné qu'aucune différence statistique n'existe entre les différentes doses d'IL-1 $\beta$ , l'activité MMP-2 est comparée entre groupes et entre échantillons stimulés (toutes doses confondues) ou non. CTL=contrôle ; IL-1 $\beta$ =interleukine-1 $\beta$ . \*significativement différent du contrôle respectif ; \$ significativement différent du groupe B ( $P < 0,05$  ; ANOVA 2). nA=9 ; nB=12. Les données sont montrées sous forme de moyennes avec leur écart-type.

La zymographie des surnageants a également été réalisée en standardisant par rapport à une quantité de 2  $\mu$ g de protéines des chondrocytes. Dans le groupe A, une stimulation à l'IL-1 $\beta$  induit une augmentation significative de l'activité de la pro-MMP-2 comparé au contrôle (Fig.18a). Dans le groupe B, on observe une augmentation de l'activité MMP dans les surnageants stimulés. Cette augmentation n'atteint cependant pas la significativité dans les surnageants stimulés avec 2,5 et 5 ng/ml d'IL-1 $\beta$ . Seuls les surnageants stimulés avec 10 ng/ml présentent une activité MMP significativement supérieure au contrôle.

L'analyse statistique indique un effet significatif d'une stimulation à l'IL-1 $\beta$  ainsi qu'un effet significatif du traitement (ANOVA 2 ;  $P < 0,05$ ). L'analyse indique également une différence significative entre les groupes A et B dans les surnageants stimulés avec 2,5, 5 et 10 ng/ml d'IL-1 $\beta$  ( $P = 0,005$ ,  $0,030$  et  $0,036$  respectivement). De plus, l'activité de la pro-MMP-2 dans les surnageants est significativement supérieure dans le groupe A comparée au groupe B (Fig.18a). Néanmoins, aucune différence significative entre les deux groupes n'a pu être démontrée dans les surnageants contrôle ( $P = 0,725$ ).

Puisqu'aucune différence significative dans l'activité MMP n'est observée entre les surnageants stimulés avec 2,5, 5 et 10 ng/ml ( $P > 0,05$ ) quel que soit le groupe, les données ont été rassemblées en tant qu'une seule dose unique de stimulation (Fig.18b). Après stimulation, l'activité gélatinolytique est significativement supérieure dans le groupe A comparé au groupe B ( $P < 0,0001$ ). Aucune différence significative entre les deux groupes n'a pu être démontrée dans les surnageants contrôle ( $P = 0,306$ ).

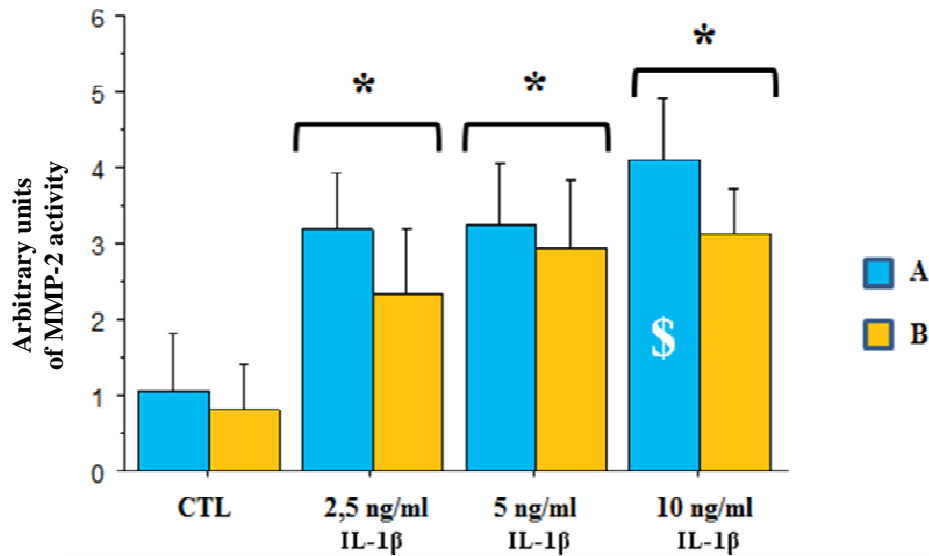
### 3.3.3 Standardisation par rapport à la concentration en protéine des surnageants



**Figure 19. Zymographie des surnageants standardisée par rapport à leur concentration en protéines.** (a) Zymographie standardisée par rapport à une quantité de 2, 6 et 8 µg de protéines de surnageants stimulés avec 5ng/ml d'IL-1β (échantillons 5 et 6) et non stimulés (échantillons 1 et 2). Les échantillons proviennent de cultures de chondrocytes réalisées à partir de chevaux sains. (b) Zymographie standardisée par rapport à une quantité de 2 et 4 µg de protéines de surnageants provenant des chevaux expérimentaux stimulés avec 2,5, 5 et 10 ng/ml d'IL-1β. CTL= contrôle

La quantité de protéines de surnageants à déposer dans chaque puits a été déterminée en testant 2, 6 et 8 µg de protéines (Fig.19a). Des cultures de chondrocytes réalisées à partir des boulets de chevaux sains ont été stimulées avec 5 ng/ml d'IL-1β. Les surnageants CTL correspondent aux échantillons 1 et 2 tandis que les surnageants stimulés correspondent aux échantillons 5 et 6. A première vue, des bandes correspondant à une activité pro-MMP-2 sont observées dans chaque échantillon et pour n'importe quelle quantité de protéines testée. Néanmoins à partir de 6 µg de protéines, l'activité gélatinolytique des échantillons stimulés est telle que la distinction entre les différentes bandes s'atténue, rendant la lecture et la quantification plus difficile.

En utilisant une quantité de 2 µg de protéines par puits, l'activité MMP-2 dans les surnageants expérimentaux se révèle très faible (Fig.19b). Dès lors, une quantité de 4 µg a été testée. Si l'on compare les gels obtenus, une activité MMP-2 est observée et elle est supérieure à celle des gels réalisés avec 2 µg de protéines.



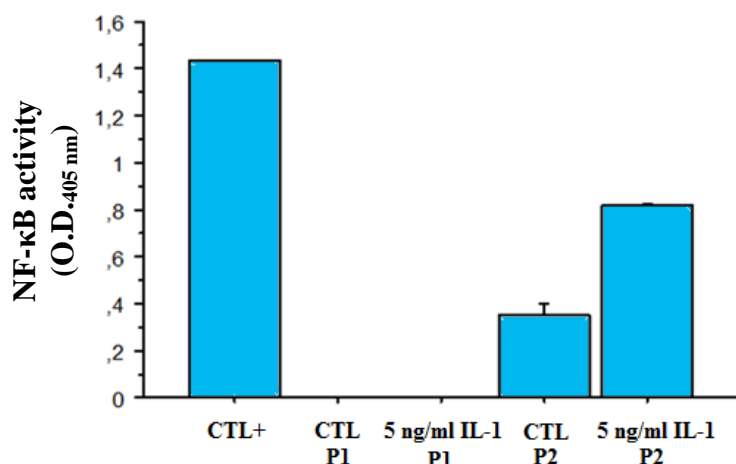
**Figure 21. Activité pro-MMP-2 dans les surnageants non stimulés (CTL) et stimulés avec 2,5, 5 et 10 ng/ml d'IL-1β.** L'activité MMP-2 a été déterminée par zymographie standardisée avec une quantité de 4 µg de protéines de surnageant puis comparée entre groupes et entre les différentes doses d'IL-1β. \*significativement différent du contrôle respectif ; \$ significativement différent du groupe B. CTL= contrôle ; IL-1β=interleukine-1β. (ANOVA 2 ; nA=9 ; nB=12). Les données sont montrées sous forme de moyennes et leurs écart-types.

La figure 21 montre l'activité de la pro-MMP-2 dans les surnageants par zymographie standardisée par rapport à une quantité de 4 µg de protéines. L'analyse statistique indique un effet significatif d'une stimulation à L'IL-1β ( $P < 0,05$ ) ainsi qu'un effet significatif du traitement ( $P = 0,0046$ ). Aucune différence significative n'est observée entre le groupe A et le groupe B dans les surnageants stimulés avec 2,5 et 5 ng/ml d'IL-1β ( $P = 0,0732$  et  $0,500$  respectivement). Néanmoins les échantillons du groupe A présentent une activité pro-MMP-2 significativement supérieure au groupe B ( $P = 0,029$ ).

Dans les deux groupes, une stimulation à l'IL-1β induit une augmentation significative de l'activité de la pro-MMP-2 comparé à leur contrôle respectif ( $P < 0,05$ ).



### 3.4 Quantification de NF- $\kappa$ B actif dans les extraits nucléaires



**Figure 22. Quantification de NF- $\kappa$ B activé par Trans-AM anti-p65.** Des cultures de chondrocytes ont été préparées à partir des boulets de chevaux sains puis stimulées avec 5 ng/ml d'IL-1 $\beta$ . Des extraits nucléaires ont été réalisés selon un protocole n°1 (P1) et un protocole n°2 (P2). Les extraits préparés selon le protocole n°1 ne semblent pas permettre une quantification de p65. NF- $\kappa$ B est observé dans les extraits nucléaires préparés selon le protocole n°2 et une stimulation à l'IL-1 $\beta$  induit une augmentation de l'activité du facteur de transcription. CTL+ : contrôle positif ; CTL : contrôle.

Des tests préliminaires (Fig.22) suggèrent que l'anticorps anti-p65 reconnaît p65 équin dans les extraits nucléaires préparés selon le protocole n°2 (voir p.21). Une augmentation de la quantité de NF- $\kappa$ B est observée dans les extraits stimulés avec 5 ng/ml d'IL-1 $\beta$  comparée au contrôle tandis qu'une extraction selon le protocole n°1 ne semble pas appropriée pour révéler NF- $\kappa$ B activé.

Le tableau 4 reprend les valeurs d'absorbance de la Trans-AM p65 correspondant aux extraits nucléaires des chevaux n°8, 11, 12, 13 et 14 réalisés selon le protocole n°2. Bien que le contrôle positif indique que la manipulation a été réalisée de manière correcte, les valeurs d'absorbance des extraits nucléaires se situent à hauteur de la valeur du blanc. La même expérience réalisée sur la deuxième série expérimentale aboutit aux mêmes résultats. Malgré les résultats prometteurs des tests préliminaires, la quantification de NF- $\kappa$ B ne semble pas possible dans les extraits nucléaires préparés.

### **3.5 Immunofluorescence de p65**

La figure 23 présente les microscopies confocales de chondrocytes marqués avec l'anticorps anti-p65 (en vert). Les chondrocytes ont été stimulés avec 5 ng/ml d'IL-1 $\beta$  pendant 15, 30 et 40 minutes. Un marquage des noyaux au TO-PRO-3, un agent intercalant, a également été effectué.

Les chondrocytes non stimulés présentent une fluorescence localisée dans le cytoplasme de la cellule. Après 15 et 30 min de stimulation à l'IL-1 $\beta$ , la fluorescence est toujours localisée dans le cytoplasme de la cellule bien qu'une légère fluorescence est observée dans le noyau à 30 min. Après 40 min de stimulation, une grande quantité de fluorescence est émise dans le noyau des cellules et une co-localisation avec le TO-PRO-3 confirme la translocation de la protéine p65. Ces résultats confirment également que l'anticorps anti-p65 reconnaît la protéine p65 équine.

## 4. Discussion, conclusion et perspectives

Une étude menée récemment par Clegg *et al.* chez des chevaux atteints d'ostéoarthrite concernant l'efficacité d'une combinaison de glucosamine et de chondroïtine sulfate comparée à l'administration d'un agent seul a déjà été investiguée (2006). Néanmoins, elle s'appuie comme bien d'autres études *in vivo* sur une atténuation des symptômes de la pathologie chez les sujets expérimentaux. De plus, bien que de nombreuses études *in vitro* confirment l'efficacité des constituants seuls sur la réponse des chondrocytes à l'IL-1 $\beta$  ou sur des chondrocytes provenant d'explants ostéoarthriques, aucune étude *in vivo* ou *in vitro* n'atteste au moyen de techniques moléculaires de l'efficacité supérieure d'une combinaison des constituants sur l'administration d'un composé seul.

Ainsi, l'objectif de la présente étude était d'investiguer l'effet d'une complémentation *in vivo* de six semaines à base de glucosamine, chondroïtine sulfate et d'extraits d'*Harpagophytum procumbens* sur le liquide synovial et les chondrocytes de jeunes chevaux sains. Dans l'hypothèse où le complément aurait un effet, une modulation dans l'activité MMP-2 devrait être observée comparée aux poneys complémentés avec un placebo. Cette étude était également l'occasion d'investiguer le mécanisme d'action par lequel le complément agit. Ainsi, l'expression des MMP étant sous le contrôle de NF- $\kappa$ B, l'administration du complément devrait moduler l'activation du facteur de transcription. Par manque de temps, une complémentation *in vitro* de culture de chondrocytes avec les agents seuls, n'a pas encore pu être étudiée mais c'est un aspect de l'investigation qui sera réalisée ultérieurement. Cet aspect se verra néanmoins plus difficile à réaliser *in vivo*. En effet, le complément utilisé pour notre expérimentation est un produit commercialisé par une société.

Rappelons également que cette étude s'inscrit dans la continuité d'une précédente expérimentation réalisée par Daix *et al.* (2007). Notons cependant que l'aspect cellulaire a été investigué plus en profondeur dans notre expérimentation et que le schéma expérimental appliqué est exactement identique que précédemment. Seules les doses de glucosamine, de chondroïtine sulfate et d'*Harpagophytum procumbens* ont été modifiées de sorte que les poneys ont reçu une double dose en complément par rapport à l'expérimentation précédente. Enfin, les résultats de notre étude corroborent ceux obtenus dans l'expérimentation précédente.

### 4.1 Examens orthopédiques

Dans notre étude, un examen orthopédique a été effectué et des scores de boiterie ont été attribués avant (T0) et après complémentation (T6). Le groupe A, complémenté avec le nutraceutique, présente un score de boiterie à T6 significativement inférieur à celui établi à T0 suggérant un effet bénéfique d'une complémentation de six semaines. Ces résultats sont néanmoins à prendre avec précaution puisqu'une articulation est une structure complexe comprenant divers éléments (muscles, tendons, ligaments). Une boiterie ne résulte donc pas forcément d'une atteinte du cartilage articulaire et aucun examen complémentaire (radiographie, échographie, IRM) permettant de préciser l'origine des irrégularités d'allure ou de boiterie n'a été effectué dans la présente étude. En plus, les poneys étaient cliniquement sains avec des scores de boiterie faibles et ils maintenus avec un régime d'exercice très modérée (accès en prairie). Néanmoins, plusieurs études investiguant l'effet d'une complémentation à base de glycosaminoglycanes polysulfatés (PSGAG) sur la boiterie confirment nos résultats. Une étude menée récemment par Fujiki *et al.* montre que

l'injection en intramusculaire de PSGAG induit une diminution significative du score de boiterie chez les chiens atteints d'ostéoarthrite (2007). Une autre étude menée sur le même modèle animal confirme qu'une complémentation orale à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate induit, après 70 jours, une amélioration significative de la douleur et de la boiterie (McCarty *et al.*, 2006). Enfin, Forsyth montre qu'une complémentation orale de 12 semaines induit également une amélioration du mouvement articulaire ainsi qu'une amélioration de la longueur des foulées des chevaux âgés (Forsyth *et al.*, 2006).

#### 4.2 Quantification de l'activité MMP-2

Les MMP sont des endopeptidases à l'origine de processus tant physiologiques que pathologiques. Ainsi, une activité MMP-2 et -9 synoviale élevée est la principale caractéristique des pathologies articulaires tant chez l'homme que chez le cheval, suggérant leur implication dans la poursuite du processus ainsi que leur utilisation potentielle en tant que marqueur clinique (Clegg *et al.*, 1997).

Les études *in vitro* confirment un effet inhibiteur des nutraceutiques sur l'expression et l'activité des MMP. D'Abusco *et al.* montrent dans une étude qu'un prétraitement de chondrocytes à la glucosamine induit l'inhibition de l'expression des MMP-1, -3 et -13 après stimulation à l'IL-1 $\beta$  (2007). D'autres comme Legendre *et al.* démontrent un effet identique sur des chondrocytes mais avec un prétraitement au chondroïtine sulfate (2008). L'*Harpagophytum procumbens* semble également disposer de telles propriétés puisqu'une étude menée par Schulze-Tanzil *et al.* montre que des chondrocytes traités avec des extraits de cette plante induit une diminution significative dans la production des MMP-1, -3 et -9 (2004). Le même effet devrait donc en théorie être retrouvé après une complémentation *in vivo*.

Après six semaines de complémentation avec le nutraceutique ou le placebo, la synovie a été prélevée au niveau des boulets et l'activité MMP-2 synoviale a été quantifiée. Le cartilage articulaire des boulets antérieurs et postérieurs gauche ont été également récupérés post-mortem, les chondrocytes isolés et des cultures cellulaires ont été réalisées. De manière à investiguer la réponse des chondrocytes complémentés à une stimulation à l'IL-1 $\beta$ , les cellules ont été stimulées avec des doses de 2,5, 5 et 10 ng/ml d'IL-1 $\beta$  pendant 24h et les surnageants, une fois collectés, ont été analysés par zymographie de manière à quantifier l'activité pro-MMP-2.

De manière étonnante, nos résultats, tant *in vivo* que *in vitro*, indiquent une augmentation significative de l'activité de la pro-MMP-2 des chevaux complémentés comparé au groupe placebo alors qu'une diminution était théoriquement attendue. En effet, la glucosamine et l'*Harpagophytum procumbens* ayant une action inhibitrice sur l'activation et la translocation de NF- $\kappa$ B (Largo *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2005), il est surprenant de constater une augmentation de l'activité MMP-2 après stimulation à l'IL-1 $\beta$  dans le groupe complémenté. Une explication pourrait se situer au niveau des mécanismes de type épigénétique. Dans l'hypothèse où le complément agirait sur les enzymes responsable de l'acétylation et/ou de la déméthylation de l'ADN, l'accessibilité au gène de la MMP-2 par l'ARN polymérase s'en retrouverait facilitée suggérant une expression accrue du gène. Cette hypothèse devrait être approfondie ultérieurement.

*In vitro*, cette activité supérieure dans les surnageants s'interprète différemment suivant la standardisation appliquée. Ainsi, les cellules n'ayant pas répondu de manière uniforme à l'IL-1 $\beta$ , une standardisation par rapport aux protéines des chondrocytes a été appliquée. Une différence dans l'activité se traduira alors par une différence dans la quantité en MMP. Une standardisation par rapport à une certaine quantité de protéines de surnageant suggère que l'on dépose une même quantité de MMP dans chaque puits. Elle fournit quant à elle une information concernant l'activité de la MMP-2. On observe donc à la fois une surproduction de la MMP-2 mais également une augmentation de son activité dans le groupe complémenté. Bien que Orth *et al.* aient déjà démontré qu'un traitement avec une combinaison de glucosamine et chondroïtine sulfate n'exerce aucun effet sur l'activité MMP-2 (2002), nos résultats suivent néanmoins ceux obtenus lors d'une expérience antérieure effectuée par Vandendriessche et Daix *et al.* (2007). De manière à corroborer ces résultats, il serait fort intéressant de quantifier l'activité du principal inhibiteur de la MMP-2, le TIMP-2 mais également de réaliser une extraction d'ARN afin de pouvoir quantifier l'ARNm de la MMP-2 présent dans les chondrocytes.

Une activité MMP-2 élevée ne signifie nullement que l'enzyme participe à un processus pathologique quelconque ou que le complément favorise l'activité MMP de manière générale. Les MMP-2 et -9 sont des gélatinases, elles dégradent les collagènes dénaturés participant au renouvellement de la matrice extracellulaire et au remodelage tissulaire. Ainsi, MacLauchlan *et al.* démontre que des souris mutantes pour le gène de la thrombospondine-2 (protéine aux effets pro-apoptotique, anti-angiogénique et inhibitrice de l'activité MMP) présentent une capacité de cicatrisation accrue alors que l'activité MMP-2 et MMP-9 au sein de la blessure est élevée comparée aux souris sauvages. L'auteur suggère dès lors une action favorable de ces enzymes sur la réparation tissulaire de la peau (2004). De plus, il ne faut pas oublier que les animaux expérimentaux étaient des sujets jeunes, en pleine croissance chez lesquels le remaniement tissulaire est important.

Les MMP-1, -3 et -13 sont les métalloprotéases les plus fréquemment décrites dans la littérature concernant la recherche de l'effet chondroprotecteur d'un complément. Des cultures de chondrocytes complémentées avec une combinaison de glucosamine et de chondroïtine sulfate induit une inhibition dans l'expression de ces enzymes (Neil *et al.*, 2005 ; Legendre *et al.*, 2008). Dès lors, il serait vraiment intéressant de voir si une diminution dans l'activité et dans l'expression de ces MMP est observée dans nos échantillons expérimentaux. Le manque de temps lié à la mise au point de la gélatine zymographie ne nous a cependant pas permis de pouvoir tester ces hypothèses.

Bien que la zymographie possède l'avantage de pouvoir discriminer les différentes formes des MMP (active, inactive), il semble que la détection des collagénases soit rendue difficile par cette technique lié probablement par la faible concentration de ces enzymes au sein des tissus (Lombart *et al.*, 2005). Une extraction de l'ARNm de ces collagénases par RT-PCR pourrait nous fournir une information concernant l'expression de ces enzymes tandis que des tests basés sur la dégradation de probes fluorescents pourraient éventuellement nous informer quant à l'activité de ces enzymes. Des tests colorimétriques basés sur de l'urokinase modifiée sont également disponibles. Néanmoins, les peptides utilisés ne sont pas spécifiques d'une MMP particulière ce qui nécessite une purification préalable de l'échantillon avant son utilisation. De plus l'information fournie par ces tests traduit une activité lytique globale puisqu'ils ne font pas la distinction entre forme active et inactive des MMP.

Un dosage des protéines totales dans la synovie a été réalisé et il apparaît que la concentration en protéines synoviales des chevaux du groupe A est significativement inférieure à celle du groupe B (~15%). Le complément ayant des propriétés anti-inflammatoires de par son contenu en extraits d'*Harpagophytum*, il est possible que la complémentation diminue la perméabilité des vaisseaux sanguins de la membrane synoviale. En effet, Guterriez et ses collaborateurs ont déjà démontré que l'administration d'iridoïdes extraits de *Buddleia scordioides* à des lapins induit une inhibition de la perméabilité microvasculaire (2006). Le liquide synovial résultant de l'ultrafiltration du plasma sanguin (Levick, 1995), l'apport en protéines plasmatiques de la synovie s'en retrouverait donc altéré diminuant d'une certaine manière la concentration en protéine. De manière à pouvoir confirmer cette hypothèse, un dosage de l' $\alpha_2$ -macroglobuline synoviale se révèle dès lors très intéressant.

Le contenu total en protéines synoviales constitue en soi un marqueur de pathologies inflammatoires. En effet, la libération de facteurs pro-inflammatoires durant un processus pathologique induit une augmentation de la perméabilité de la membrane synoviale, favorisant la migration de cellules immunitaires vers le site inflammatoire. Cette migration s'accompagne également d'un afflux d'une certaine fraction du plasma dans la cavité synoviale. Ainsi, les valeurs supérieures à 25 mg/ml de synovie sont considérées comme pathologiques (McIlwraith, 2002). Les moyennes de nos chevaux se situent entre 8 et 10 mg/ml de protéines totales. Nos chevaux sont donc sains puisque la norme est comprise entre 5 et 10 mg/ml de protéines totales (Tew and Hotchkiss, 1980). Il est dès lors difficile de déterminer si la différence observée ci-dessus entre les groupes résulte d'un effet du complément ou d'une variabilité individuelle. Par conséquent, il serait intéressant de vérifier l'effet du complément sur la concentration en protéines synoviales de chevaux pathologiques. Néanmoins, il semble que la concentration en protéines synoviales totales ne constitue pas un critère unique pour l'établissement d'un diagnostic pathologique de maladies dégénératives du cartilage puisque, selon certains auteurs, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les chevaux sains et les chevaux atteints (van Pelt, 1974 ; Malhaffey, 2002). C'est pourquoi d'autres critères sont pris en compte tels que la viscosité de la synovie ainsi que la proportion en cellules mononuclées et polynuclées.

#### 4.3 Quantification de NF- $\kappa$ B activé

De manière à étudier l'effet du complément sur l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, des extraits nucléaires ont été préparés à partir des cultures de chondrocytes de chevaux complémentés selon deux protocoles puisqu'au départ, deux techniques étaient envisagées, l'EMSA (Electro Mobility Shift Assay) et la Trans-AM. L'EMSA n'étant plus pratiquée au sein des Facultés, notre choix s'est donc porté sur la pratique de la Trans-AM. A l'heure actuelle, peu d'anticorps adaptés à la reconnaissance de protéines équine sont disponibles sur le marché et c'est pourquoi un test Trans-AM anti-p65 et anti-p50 a préalablement été effectué sur des extraits nucléaires de chevaux sains non expérimentaux. Bien que ces anticorps soient adaptés à la reconnaissance des protéines p65 et p50 murines et humaines, les résultats du test suggéraient que l'anticorps anti-p65 reconnaît la protéine p65 équine. Par contre, il ne semble pas possible de détecter une quelconque capacité de binding de NF- $\kappa$ B à partir de l'anticorps anti-p50. De plus, il apparaît que seuls les extraits préparés à partir du protocole n°2 (adapté pour une EMSA) permettent de détecter et de quantifier NF- $\kappa$ B activé.

Devant ces résultats encourageants, la Trans-AM anti-p65 a été appliquée ensuite aux extraits nucléaires des chevaux n°8, 11, 12, 13 et 14. Les extraits ayant été réalisés en triplicats pour chaque condition étudiée, la première série expérimentale a été testée. Néanmoins, les valeurs d'absorbance obtenues sont à peine supérieures à la valeur du blanc. En supposant une erreur de notre part durant la manipulation, l'expérimentation a de nouveau été réalisée sur la deuxième série expérimentale et, force est de constater que les résultats obtenus sont identiques à la première série expérimentale (Tableau 1) et qu'aucune capacité de liaison de NF- $\kappa$ B n'a pu être mise en évidence dans ces extraits. L'approche n'a donc pas été étendue aux autres échantillons expérimentaux.

L'immunofluorescence représente une alternative à la Trans-AM pour l'étude de NF- $\kappa$ B. Cette technique présente, en outre, l'avantage de ne consommer que peu de matériel cellulaire, un facteur non négligeable dans notre expérimentation. De manière à préparer la technique pour une prochaine investigation de l'effet du complément alimentaire sur le cartilage articulaire, des cultures de chondrocytes de chevaux sains ont été préparées en vue d'une immunofluorescence de la protéine p65. Ces cellules, après stimulation, ont ensuite été marquées avec le même anticorps anti-p65 que celui utilisé dans la technique Trans-AM. Les résultats confirment que l'anticorps anti-p65 reconnaît de manière spécifique la protéine p65 et que ce même anticorps est également applicable en immunofluorescence. Un temps de stimulation de 40 min avec 5 ng/ml d'IL-1 $\beta$  semble suffire pour induire une translocation de la protéine p65 dans le noyau des cellules.

L'étape suivante aurait été d'investiguer *in vitro* l'effet du complément sur la translocation de p65 par immunofluorescence. Néanmoins, le manque de temps ne nous a malheureusement pas permis de réaliser cette partie de l'expérimentation.

#### 4.4 Conclusion et perspectives

L'utilisation du cheval en tant que sportif de haut niveau prédispose l'animal aux pathologies articulaires très invalidantes telles que l'ostéoarthrite. La découverte de molécules non médicamenteuses aux effets chondroprotecteurs *in vitro* a permis la mise sur le marché d'un moyen thérapeutique alternatif aux anti-inflammatoires puisque ces molécules, appelées nutraceutiques, ont l'avantage d'être dépourvues d'effets secondaires. Néanmoins, plusieurs études attestant de leur efficacité *in vivo* ont déjà été effectuées tant chez l'homme que chez l'animal mais elles ne se basent que sur une atténuation des symptômes des individus atteints de pathologies articulaires. Ainsi, tandis que certains auteurs indiquent un effet d'une complémentation sur les pathologies articulaires (Pavelka *et al.*, 2003), d'autres affirment le contraire (Clegg *et al.*, 2006) d'où la controverse quant à l'efficacité de ces compléments alimentaires sur l'organisme. Il est donc devenu nécessaire d'investiguer l'efficacité de ces compléments *in vivo* au moyen d'outils moléculaires.

De manière à investiguer l'effet d'une complémentation orale de six semaines avec un nutraceutique contenant de la glucosamine, du chondroïtine sulfate et des extraits d'*Harpagophytum procumbens* sur l'équilibre enzymatique articulaire de chevaux sains, des poneys ont été divisés en deux groupes dont l'un a reçu le nutraceutique, et l'autre un placebo. Au terme de la complémentation, des examens orthopédiques ont été effectués, la synovie collectée et des cultures de chondrocytes ont été réalisées à partir des boulets des chevaux expérimentaux.

Les examens orthopédiques effectués indiquent une diminution de la boiterie dans le groupe de poneys complémentés avec le nutraceutique entre T0 et T6. La concentration en protéine totale constitue également un marqueur de l'inflammation. Un dosage de protéine a été effectué et il apparaît que la concentration en protéines synoviales est significativement inférieure dans le groupe complémenté avec le nutraceutique.

La glucosamine, le chondroïtine sulfate et l'*Harpagophytum procumbens* inhibent *in vitro* la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans l'expression du gène des MMP. Alors qu'une diminution dans l'activité MMP était attendue, il semble que le complément induit une augmentation significative de l'activité MMP-2 dans le liquide synovial et dans les surnageants. La quantification de NF- $\kappa$ B activé dans nos extraits nucléaires aurait été utile pour pouvoir corrélérer ces résultats mais leur analyse par Trans-AM n'a malheureusement pas été possible et une répétition du protocole expérimental a été impossible en raison de sa lourdeur sur le plan pratique.

En conclusion, affirmer que le complément agit *in vivo* de manière efficace sur l'articulation de chevaux sains est encore prématuré. Une investigation plus approfondie devrait être ultérieurement effectuée notamment par la quantification de l'activité d'autres MMP dans les échantillons de synovie et les surnageants. Le facteur de transcription AP-1 participant également dans l'expression des MMP, son activation et sa translocation devrait également être étudiée. Enfin, il ne faut pas non plus oublier que les chondrocytes ne constituent pas le seul type cellulaire présent dans une articulation. C'est pourquoi l'investigation devrait être étendue à d'autres types cellulaires tels que les synoviocytes ou encore les fibroblastes de ligaments et de tendons.



## 5. Bibliographie

- Abramson, S.B. Osteoarthritis and NO. *Osteoarthritis and Cartilage* **16**, S15-S20 (2008)
- Aigner, T. and Stöve, J. Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1569-1593 (2003)
- Ameye, L.G. and Chee, W.S. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Research & Therapy* **8**, R127
- Archer, C.W. and Francis-West, P. The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 401-404 (2003)
- Arican, M., Coughlan, A.R., Clegg, P.D. and Carter, S.D. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 activity in bovine synovial fluids. *J. Vet. Med. A-Physiol. Pathol. Clin.* **47**, 449-456 (2000)
- Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N.A. and Serhan, C.N. Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolving E1. *J Exp Med.* **201**, 713-722 (2005)
- Au, R.Y., Al-Talib, T.K., Au, A.Y., Phan, P.V. and Frondoza, C.G. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**, 1249-1255 (2007)
- Baker, A.H., Edwards, D.R. and Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* **115**, 3719-3727 (2002)
- Beinke, S. and Ley, S.C. Functions of NF- $\kappa$ B1 et NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem. J.* **382**, 393-409 (2004)
- Birdekal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Bidekal-Hansen, B., DeCarlo, A. and Engler, J.A. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **4**, 197-250 (1993)
- Bureau, F., Bonizzi, G., Kirschvink, N., Delhalle, S., Desmecht, D., Merville, M.-P., Bours, V. and Lekeux, P. Correlation between Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity in Bronchial Brushing Samples and Lung Dysfunction in an Animal Model of Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1314-1321 (2000)
- Clark, I.M., Swingle, T.E., Sampieri, C.L. and Edwards, D.R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **xxx**, xxx-xxx (2008)

Clegg D.O., Reda D.J., Harris C.L., Klein M.A., O'Dell J.R., Hooper M.M., Bradley J.D., Bingham C.O. 3rd, Weisman M.H., Jackson C.G., Lane N.E., Cush J.J., Moreland L.W., Schumacher H.R. Jr, Oddis C.V., Wolfe F., Molitor J.A., Yocum D.E., Schnitzer T.J., Furst D.E., Sawitzke A.D., Shi H., Brandt K.D., Moskowitz R.W., Williams H.J. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *N Eng J Med* **354**, 795-808 (2006)

Clegg, P.D., Burket, R.M., Coughlan, A.R., Riggs, C.M. and Carter, S.D. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Veterinary Journal* **29**, 335-342 (1997)

Clegg, P.D., Jones, M.D. and Carter, S.D. The effect of drugs commonly used in the treatment of equine articular disorders on the activity of equine matrix metalloproteinase-2 and 9. *J. vet. Pharmacol. Therap.* **21**, 406-413 (1998)

Cremer, M.A., Rosloniec, E.F. and Kang A.H. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic diseases. *J Mol Med* **76**, 275-288 (1998)

Curtis, C.L., Hughes, C.E., Flannery, C.R., Little, C.B., Harwood, J.L. and Caterson, B. n-3 Fatty Acids Specifically Modulate Catabolic Factors Involved in Articular Cartilage Degradation. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 721-724 (2000)

Curtis, C.L., Rees, S.G., Little, C.B., Flannery, C.R., Hughes, C.E., Wilson, C., Dent, C.M. Otterness, I.G., Harwood, J.L. and Caterson, B. Pathologic Indicators of Degradation and Inflammation in Human Osteoarthritic Cartilage Are Abrogated by Exposure to n-3 Fatty Acids. *Arthritis and Rheumatism* **46**, 1544-1553 (2002)

D'Abusco, A.S., Calamia, V., Cicione, C., Grigolo B., Politi, L. and Scandurra, R. Glucosamine affects intracellular signalling through inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **9**, R104 (2007)

Daix M., Wiggers, L., Raes, M. and Kirschvink, N. Effect of an oral glucosamine and chondroitin sulphate supplementation on *in vivo* and *in vitro* articular enzymatic and oxidative stress in ponies. In *proceedings:10<sup>th</sup> congress of equine medicine and surgery*, Geneva, Switzerland (2007)

Ding, C. Do NSAIDs affect the progression of osteoarthritis? *Inflammation* **26**, 139-142 (2002)

Dodge, G.R. and Jimenez, M.D. Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **11**, 424-432 (2003)

Dudhia, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2241-2256 (2005)

Eddington, N.D., Ianping, D. and White, N.A. Evidence of the oral absorption of chondroitin sulfate as determined by total disaccharide content after oral and intravenous administration to horses. *47<sup>th</sup> Meeting of the American Association of Equine Practitioners, Proceedings* **47**, 326-328 (2001)

- Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **4**, 30-35 (2002)
- Firestein, G.S. and Manning A.M. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis & Rheumatism* **42**, 609-621 (1999)
- Forsyth, R. K., Brigden, C. V. & Northrop, A. J. Double blind investigation of the effects of oral supplementation of combined glucosamine hydrochloride (GHCL) and chondroitin sulphate (CS) on stride characteristics of veteran horses. *Equine Vet. J. Suppl* 622-625 (2006).
- Fujiki, M., Shineha, J., Yamanokuchi, K., Misumi, K. and Sakamoto, H. Effects of treatment with polysulfated glycosaminoglycan on serum cartilage oligomeric matrix protein and C-reactive protein concentrations, serum matrix metalloproteinase-2 and -9 activities, and lameness in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res* **68**, 827-833 (2007)
- Gabay, O., Gosset, M., Levy, A., Salvat, C., Sanchez, C., Pigenet, A., Sautet, A., Jacques, C. and Berenbaum, F. Stress-induced signaling pathways in hyaline chondrocytes: inhibition by Avocado-Soybean Unsaponifiables (ASU). *Osteoarthritis and Cartilage* **16**, 373-384 (2008)
- Gagnier, J.J., Chrubasik, S. and Manheimer, E. *Harpagophytum procumbens* for osteoarthritis and low back pain: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **4**, 13 (2004)
- Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T. Collagens-Structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1531-1546 (2003)
- Goodrich, L.R. and Nixon, A.J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The veterinary Journal* **171**, 51-69 (2006)
- Gouze, J.N., Bianchi, A., Bécuwe, P., Dauça, M., Netter, P., Magdalou, J., Terlain, B. and Bordij K. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappaB pathway. *FEBS Lett.* **510**, 166-170 (2002)
- Gutierrez, R.M., Solis, R.V., Baez, E.G. and Martinez, F.M. Effect on capillary permeability in rabbits of iridoïdes from *Buddleia scordioides*. *Phytother Res.* **20**, 542-545 (2006)
- Handsley, M.M., Cross, J., Gavrilovic, J. and Edwards, D.R (2005). "The matrix metalloproteinases and their inhibitors" in *Matrix Metalloproteinases in the central nervous system* edited by Katherine Conant and Paul E Gottschall, chapter 1, **3-19 p.** (USA)
- Hedbom, E. and Häuselmann, H.J. Molecular aspect of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 45-53 (2002)
- Hijova, E. Matrix Metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy* **106**, 127-132 (2005)
- Hoffmann, A., Preobrazhenska, O., Wodarczyk, C., Medler, Y., Winkel, A., Shahab, S., Huylebroeck, D., Gross, G. and Verschueren, K. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 27271-27283 (2005)

- Huang, T.H., Tran, V.H., Duke, R.K., Tan, S., Chrubasik, S., Roufogalis, B.D. and Duke, C.C. Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF-kappa B activation. *J Ethnopharmacol.* **104**, 149-155 (2006)
- Hungerford, D.S. and Jones, L.C. Glucosamine and chondroitin sulfate are effective in the management of osteoarthritis. *The Journal of Arthroplasty* **18**, 5-9 (2003)
- Ito, A., Nose, T., Takahashi, S. and Mori, Y. Cyclooxygenase inhibitors augment the production of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* **360**, 75-79 (1995)
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H and Nozawa-Inoue, K. Morphology and functional role of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.*, **63**, 17-31 (2000)
- Jeffcott, L.B. and Hanson, F.M.D. Studies on Growth Cartilage in the horse and their Application to Aetiopathogenesis of Dyschondroplasia (Osteochondrosis). *The Veterinary Journal* **156**, 177-192 (1998)
- Jones, G.C., Riley, G.P. and Buttle, D.J. The role of proteases in pathologies of the synovial joint. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1199-1218 (2008)
- Karna, E., Milyk, W., Surazyński, A., and Palka, J.A. Protective effect of hyaluronic acid on interleukine-1-induced deregulation of beta1-integrin and insulin-like growth factor-1 receptor signaling and collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes. *Mol Cell Biochem* **308**, 57-64 (2008)
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., J Yee, A and B Yang, B. Structure and function of aggrecan. *Cell Research* **12**, 19-32 (2002)
- Kim, D.Y., Taylor, H.W., Moore, R.M., Paulsen, D.B. and Cho, D.-Y. Articular chondrocytes apoptosis in equine osteoarthritis. *The Veterinary Journal* **166**, 52-57 (2003)
- Krane, S.M. and Inada, M. Matrix Metalloproteinases and bone. *Bone* **43**, 7-18 (2008)
- Krasnokutsky, S., Samuels, J. and Abramson, S.B. Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **65**, 222-228 (2007)
- Kut-Lasserre, C., Miller, C.C., Ejeil, A.L., Gogly, B., Dridi, M., Piccardi, N., Guillou, B., Pellat, B. and Godeau, G. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. *J Periodontol.* **72**, 1685-1694 (2001)
- Largo, R., Alvarez-Soria M.A., Diez-Ortego, I., Calvo, E., Sanchez-Pernaute, O., Egido, J. and Herrero-Beaumont, G. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **11**, 290-298 (2003)
- Legendre, F., Baugé, C., Roche, R., Saurel A.S. and Pujol, J.P. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes-study in hypoxic alginate bead cultures. *Osteoarthritis and Cartilage* **16**, 105-114 (2008)
- Levick, J.R. Microvascular architecture and exchange in synovial joints. *Microcirculation* **2**, 217-233 (1995)

- Lipiello, L., Nardo, J.V., Harlan, R. and Chiou, T. Metabolic Effects of Avocado/Soy Unsaponifiables on Articular Chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med.* **5**, 191-197 (2008)
- Lombard, C., Saulnier, J. and Wallach, J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie* **87**, 265-272 (2005)
- MacLauchlan, S., Skokos, E.A., Agah, A., Zeng, J., Tian, W., Davidson, J.M., Bornstein, P. and Kyriakides, T.R. Enhanced angiogenesis and reduced concentration of thrombospondin-2 null wounds is associated with increased levels of matrix metalloproteinases 2 and 9, and soluble VEGF. *J Histochem Cytochem* (2008)
- McCarthy, G., O'Donovan, J., Jones, B., McAllister, H., Seed, M. and Mooney, C. Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J* **194**, (2007)
- McIlwraith, C.W. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. *AAEP Proceedings* **47**, 142-156 (2001)
- Meulyzer, M., Vachon, P., Beaudry, F., Vinardell, T., Richard, H., Beauchamp, H. and Laverty, S. Comparaison of pharmacokinetics of glucosamine and synovial fluid levels following administration of glucosamine sulphate or glucosamine hydrochloride. *Osteoarthritis and Cartilage* **16**, 973-979 (2008)
- Mengshol, J.A., Vincenti, M.P., Coon, C.I., Barchowsky, A. and C.E. Brinckerhoff. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor  $\kappa$ B. *Arthritis & Rheumatism* **43**, 801-811 (2000)
- Nagase, H., Visse, R. and Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMP. *Cardiovascular Research* **69**, 562-573 (2006)
- Neil, K.M., Orth, M.W., Coussens, P.M., Chan, P.S. and Caron, J.P. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on mediators of osteoarthritis in cultured equine chondrocytes stimulated by use of recombinant equine interleukin-1beta. *Am J Vet Res* **66**, 1861-1869 (2005)
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I $\kappa$ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**, 252-256 (1999)
- Orth, M.W., Peters, T.L. and Hawkins, J.N. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulfate. *Equine Vet J Suppl* 224-229 (2002).
- Piperno, M., Reboul, P., Hellio Le Graverand, M.P., Peschard, M.J., Annefeld, M., Richard, M. and Vignon, E. Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* **8**, 207-212 (2000)
- Qi, J., Chen, J.-J., Cheng, Z.-H., Zhou, J.-H., Yu, B.-Y. and Qiu, S.X. Iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw). *Phytochemistry* **67**, 1372-1377 (2006)

- Ram, M., Sherer, Y. and Shoenfeld, Y. Matrix Metalloproteinase-9 and Autoimmune diseases. *Journal of Clinical Immunology* **26**, 299-307 (2006)
- Roughley, P.J. Articular cartilage and changes in arthritis Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of the cartilage. *Arthritis Res.* **3**, 342-347 (2001)
- Roughley, P.J. The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells and Materials* **12**, 92-101 (2006)
- Sandell, L.J. and Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis-An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* **3**, 107-113 (2001)
- Sandersen, C., Bureau, F., Turlej, R., Fiévez, L., Dogné, S., Kirschvink, N. and Lekeux, P. p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **80**, 315-326 (2001)
- Schulze-Tanzil, G., Hansen, C., Shakibaei, M. Effect of a Harpagophytum procumbens DC extract on matrix metalloproteinase in human chondrocytes in vitro. *Arzneimittelforschung.* **54**, 213-220 (2004)
- Shakibaei, M., John, T., Schulze-Tanzil, G., Lehmann, I. and Mobasheri, A. Suppression of NF- $\kappa$ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology* **73**, 1434-1445 (2007)
- Stewart, K.M. and Cole D. The commercial harvest of devil's claw (*Harpagophytum* spp.) in southern Africa: the devil's in the details. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 225-236 (2005)
- Tiku, M.L., Narla, H., Jain, M. and Yalamanchili, P. Glucosamine prevents *in vitro* collagen degradation in chondrocytes by inhibiting advanced lipoxidation reactions and protein oxidation. *Arthritis Research & Therapy* **9**, R76 (2007)
- Todhunter, R.J. and Lust, G. Synovial joint anatomy, biology and pathobiology. *Auer J.A. (Ed.): Equine Surgery*, 844-867 (1992)
- Vandendriessche, M. *Investigation de l'effet d'un complément alimentaire à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur l'équilibre articulaire chez le cheval sain au repos*. Mémoire en vue d'une licence en sciences biologiques, FUNDP, Belgique, 66 p. (2007)
- Verma, U.N., Yamamoto, Y., Prajapati, S. and Gaynor, R.B. Nuclear Role of I $\kappa$ B Kinase- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B Essential Modulator (IKK $\gamma$ -NEMO) in NF- $\kappa$ B-dependent Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 3509-3515 (2004)
- Visse, R. and Nagase, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.* **92**, 827-839 (2003)
- Vincenti, M.P. and Brinckerhoff, C.E. Signal Transduction and Cell-Type Specific Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression: Can MMPs be Good for You? *J. Cell. Physiol.* **213**, 355-364 (2007)
- Vincenti, M.P. and Brinckerhoff, C.E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* **4**, 157-164 (2001)

Waddell, D.D., Kolomytkin, O.V., Dunn, S. and Marino, A.A. Hyaluronan suppresses IL-1beta-induced metalloproteinase activity from synovial tissue. *Clin Orthop Relat Res* **465**, 241-248 (2007)

Yacoubian, S. and Serhan C.N. New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implications for rheumatic diseases. *Nature Clinical Practice Rheumatology* **3**, 570-579 (2007)

Ytrehus, B., Carlson, C.S. and Ekman, S. Etiology and Pathogenesis of Osteochondrosis. *Vet Pathol* **44**, 429-448 (2007)







